ISBN 978-987-688-033-6

Reproducción equina III

Trabajos presentados en el III Congreso Argentino de Reproducción Equina

Luis Losinno
Compilador

III CONGRESO ARGENTINO DE REPRODUCCION EQUINA

ARGENTINE CONGRESS ON EQUINE REPRODUCTION

e-book

UniRío editora

Reproducción equina III : trabajos presentados en el Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina /
1a ed. - Río Cuarto : UniRío Editora. . , 2013.
E-Book.
ISBN 978-987-688-033-6
1. Equinos. 2. Reproducción. 3. Ginecología Veterinaria.
CDD 636.1

Fecha de catalogación: 03/12/2012

Reproducción equina III

Trabajos presentados en el Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina

Luis Losinno (Compilador)

2012 © by UniRío editora. Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina
Tel: 54 (358) 467 6309 – Fax: 54 (358) 468 0280
editorial@rec.unrc.edu.ar - www.unrc.edu.ar/unrc/editorial.cdc

ISBN 978-987-688-033-6

Primera Edición: *marzo de 2013*

Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.

http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/ar/deed.es_AR

Uni. Tres primeras letras de “Universidad”. Uso popular muy nuestro; la Uni.
Universidad del latín “universitas” (personas dedicadas al ocio del saber),
se contextualiza para nosotros en nuestro anclaje territorial y en la concepción
de conocimientos y saberes construidos y compartidos socialmente.
El río. Celeste y Naranja. El agua y la arena de nuestro Río Cuarto
en constante confluencia y devenir.
La gota. El acento y el impacto visual: agua en un movimiento
de vuelo libre de un “nosotros”.
Conocimiento que circula y calma la sed.

Consejo Editorial

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Prof. Laura Ugnia y Prof. Mercedes Ibañez

Facultad de Ciencias Económicas
Prof. Mónica Re

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Prof. Sandra Miskoski y Prof. Julio Barros

Facultad de Ciencias Humanas
Prof. Silvina Barroso

Facultad de Ingeniería
Prof. Marcelo Gioda y Prof. Jorge Vicario

Biblioteca Central Juan Filloy
Lic. Irma Milanesio y Bibl. Claudia Rodríguez

Secretaría Académica
Prof. Claudio Asaad y Prof. M. Elena Berruti

Equipo Editorial

Secretario Académico:	*Claudio Asaad*
Directora:	*Elena Berruti*
Equipo:	*José Luis Ammann, Daila Prado, Maximiliano Brito, Daniel Ferniot*

Índice

Apartado I

Peri-parturient problems....8
AO McKinnon

Problemas del periparto en la yegua....27
AO McKinnon

Some selected diseases of the breeding stallion....53
AO McKinnon

Enfermedades y alteraciones de padrillos en servicio....64
AO McKinnon

Uterine abnormalities....78
AO McKinnon

Anormalidades uterinas....96
AO McKinnon

Apartado II

La administración de hCG en diferentes momentos del día afecta el momento de ovulación en yeguas....127
Azcurra M; Mora M M; Vlek J; Olivera M; Morete M; de La Sota R L

Doppler ultrasonography evaluation of vascularity in the wall of preovulatory follicles in mares treated with deslorelin: preliminary results....130
Boakari YL; Ferreira JC; Canesin HS; Meira C.

Fatores ambientais que afetam o tempo de gestação em éguas Puro Sangue Inglês - dados preliminares....134
Bueno V; Saraiva NM; Haetinguer C; Curcio B; Nogueira CEW

Perfusão vascular uterina durante o período luteolítico em éguas....137
Canesin HS; Ignácio FS; Ferreira JC; Romano RM; Pantoja JCF; Boakari Yl; Meira C.

Componentes do leite de éguas da raça Crioula....141
Costa GV; Alves LP; Bondan C; Fiala Rechsteiner S.

Eficiência reprodutiva de cavalos crioulos em sistema de monta controlada no Rio Grande do Sul....145
Costa VGG; Andriola YT; Duval LH; Duval EH; Duval EJCP; Corcini CD; Fiala Rechsteiner SM.

Fertilidade do cio do potro em éguas da raça Crioula....149
Duval H; Andriola YT; Costa VGG; Duval EH; Duval EJCP; Varela Junior AS; Corcini CD; Fiala Rechsteiner SM

Influence of seasonality on structural development of the corpus luteum in mares: preliminary results....153
Ferreira JC, Boakari YL, Canesin HS, Novaes Filho LF, Meira C.

Luteoprotective and anti-abortion roles of equine chorionic gonadotropin (eCG) during pregnancy in the mare 157
Flores-Flores G; Velázquez-Cantón E; Boeta M; Zarco L.

Comparacion entre gonadotrofina corionica humana (hCG) y deslorelina en sus tiempos de accion, eficacia en inducir ovulacion e incidencia de ovulaciones multiples en yeguas Pura Raza Chilena 162
Maturana J, Droguett N, Ramirez H

Influência do número de partos e do sexo do potro sobre o tempo de gestação na raça Mangalarga Paulista 166
Meirelles MG; Alonso MA; Guimarães CF; Ferreira J RM; Nichi M; Fernandes CB

Avaliação da eficiência da gonadotrofina coriônica humana em diferentes doses associada ou não à prostaglandina: resultados parciais 170
Paiva SO; Silva PCA; Janella BFS; Junqueira RGC; Siqueira BPR; Jacob JCF

Determinacion del sexo fetal equino por ultrasonografia transrectal a los 120 dias de gestacion 173
Ramírez HA; Wunder MT

Comparação da irrigação folicular de éguas jovens e idosas no momento da indução da ovulação – resultados parciais 176
Resende HL; Canesin HS; Ramires-Neto C; Pantoja JCF; Silva LA ; Alvarenga MA

Influence of hCG on progesterone production in mares 180
Romano RM; Ferreira JC; Canesin HS;Ignácio FS; Novaes Filho LF; Barros AMR; Meira C

Avaliação da eficiência do primeiro estro pós- parto em éguas da raça Crioula em diferentes idades 183
Severo GM; Schmitt FL; Antunes TE; Centena LC; Nobre GO

Aplicación de celulas madre mesenquimales de cordon umbilical como infusion intrauterina en una yegua Pura Raza Chilena. Reporte clinico 186
Wunder MT; Ramírez HA;Domeyko C; Erices A

Estudo da viabilidade da castração química em garanhões 190
Alves LP; Oliveira GA; Dau SL; Canto JI; Fiala Rechsteiner S

Plant extracts as additives in extender for cooled stallion semen 194
Bustamante-Filho IC; Davolli GM; Camozzato GC; Bastos HBA; Maciel AC; Mattos RC; Gerhardt A; Mallmann R; Oliveira JB; Ethurn EM.

Utilização de leite UHT semidesnatado e integral como alternativa de diluente para conservação de sêmen equino resfriado 198
Castro FS; Mattos RC; Fiala Rechsteiner S

Comparação da utilização de três diluentes para conservação de semen equino resfriado 202
Castro FS; Mattos RC; Fiala Rechsteiner S

Efecto del Butaphosphan y vitamina B_{12} inyectables sobre la calidad del semen fresco y refrigerado en sementales 205
Cazales N; Santos GA; Farias M, Bastos HB, Winter GH; Bustamante-Filho IC, Rodrigo Mattos RC

Efecto de diferentes metodos de concentracion sobre la calidad y tasa de recuperacion espermaticas 209
Davolli GM; Camozzato GC; Figueiredo MM, Bastos HBA; Cazales N; Mattos RC

Colheita e criopreservação de sêmen da cauda do epidídimo em equinos..... 212
Guedes Campos D; Vianna Martins A; Monteiro GA; Emerim Pinna A; de Moura Carvalho CF

Utilização de colesterol na refrigeração de sêmen de garanhões bad cooler 216
Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Carmo MT, Alvarenga MA; Papa FO, Dell`Aqua Jr JA

Descripcion cromosomica en dos padrillos emparentados 220
Hynes V; Muñoz L, Ferré DM, Saldeñaa E, Gorla N

Evaluation of viability of equine semen stored in different cooled containers for transport 224
Maciel AC; Camargo VDeA; Fiala Rechsteiner S

Congelación de semen equino en mediumflatpacks: efecto sobre la fertilidad de yeguas usando inseminación intrauterina profunda 227
Matamala F; González R; Briones M; Santa María A; Rodríguez-Martínez H; Saravia F

Comparación de dos coloides comerciales en semen equino congelado:
Equipure® vs. Percoll® 231
Morikawa MI; Guillen N; Eusebio Centeno J; Von Meyer M; Llorente J; Herrera C.

Índice de fragmentación de espermatozoides epididimales de caballos de raza Azteca 234
Parra-Forero LY; López-Fernández C; Montiel JA; Mendoza G; Pulido S; Cruz LA; Guevara-G JA; García-Contreras A

Comparison of different methods of sperm concentration in stallions subjected to spermatic selection 238
Ramires Neto C, Monteiro GA, Lacerda de Resende H, Zanzarini Delfiol DJ, Sancler da Silva YFR, Ozanam Papa F, Alvarenga MA

Efecto del plasma seminal sobre el estado redox de semen equino criopreservado..... 242
Restrepo GB; Pizarro EL; Usuga AS; Echeverry JZ; Rojano B

Eficiência reprodutiva de garanhões da raça Crioula..... 246
Schmitt FL; Severo GM; Antunes TE; Centena LC; Nobre GO

Taxa de recuperação embrionária em éguas da raça Crioula. Dados preliminares 249
Gularte Sarmento L; Araujo Lins L; Lança Schmitt F

Hiperestimulacion folicular y producción de embriones in vivo en yeguas ovulatorias y anovulatorias utilizando FSH equina recombinante..... 252
Losinno L; Miragaya MH; Mutto A; Bereterbide S; MacDonoughJ; Pietrani M; Colgin M; Ross PJ

Efecto de la edad sobre el intervalo interovulatorio y frecuencia de endometritis en yeguas donantes de embriones de raza Silla Argentino..... 257
Marinone AI ; Fumuso E ; Bruno S; Brust, A ; Herrera M; Redolatti, C; Losinno L

Evaluación preliminar de técnicas de vinculación y aprendizaje no traumático aplicadas a potrillos de raza criolla, en cría semi extensiva 261
Paz S; Flores M; Abbiati N

Apartado I

Peri-parturient problems

***AO McKinnon**, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT*

Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia

A variety of injuries and disorders develop around the time of foaling and in the immediate post partum period, that can have serious consequences for the mare. The age and breed of the dam have some influence on the incidence of these complications, but many are purely accidents associated with the rapid and often violent birth process. Frequently, diagnosis is difficult because the clinical signs of many post-partum problems are nonspecific. Early recognition of peri-partum disorders may improve the success rate of treatment. Some of these conditions are life threatening, some will seriously compromise the future reproductive career of the mare and some will cause considerable delay in the establishment of a healthy pregnancy, if not quickly recognized and treated. Ultrasonography has become an indispensable tool for the diagnosis and in some cases the monitoring of these conditions.

Some presenting signs and causes of late gestation complications in the mare are:

- VULVAL DISCHARGE
    - Vaginal varicose veins
    - Maceration of foetus
    - Vulval trauma
    - Premature placental separation
    - Urinary tract disorder
- COLIC
    - Hydrops of the foetal membranes
    - Ventral abdominal/prepubic tendon ruptures
    - Arterial haemorrhage
    - Uterine torsion
    - Abortion/premature parturition
    - Fetal hypermobility
    - Uterine rupture
    - Late pregnancy
    - Colic of non-genital tract origin
- PREMATURE MAMMARY GLAND DEVELOPMENT AND LACTATION
    - Placentitis
    - Premature placental separation
    - Twins
    - Abortion
    - Unknown cause

- VENTRAL ABDOMINAL SWELLING
  - Ventral abdominal/prepubic tendon ruptures
  - Hydrops of the foetal membranes

PRE-PARTURIENT PROBLEMS

Mummification and maceration

Mummification is not uncommon when one twin dies and the other continues to develop. Mummification of a single pregnancy is rare but has been reported(Barber and Troedsson, 1996; McCue et al., 1997; Meyers and Varner, 1991). Occasionally lactation in a late pregnant mare may suggest foetal compromise, impending abortion, or mummification, however commonly no clinical signs are recognized. Mummified foetuses are most commonly seen at birth or abortion. Maceration most commonly occurs when a single pregnancy dies and is not aborted and bacterial contamination initiates foetal autolysis. External signs of discharge may lead to the diagnosis.

Treatment for both is gentle relaxation of the cervix and then delivery. Occasionally it might be necessary to encourage cervix relaxation with either PGE or Buscopan (hyoscine butylbromide).

In mares with late term twin pregnancies we have seen naturally occurring cases of mummified foetuses with trans-abdominal ultrasonography but they can be difficult to detect. In all cases the mares were late in gestation and had started to lactate. The diagnosis of mummification was not easy as all had an additional viable pregnancy present. In our limited experience it appears that identification of the foetal head or ribs as a separate entity from the live foetus are the easiest and most consistent foetal parts to find. As the mummification process proceeds it is harder to see foetal parts because they all assume a similar echogenicity, however that is dependant on foetal age when mummification develps. Only one case had a demonstrable “twin membrane”, which probably was related to the more recent demise of that foetus. Early demise is associated with obvious echogenicity of foetal bones (Fig 1a and b).

See pictures on page 28 - 29

Hydrops

Ultrasonography is useful for diagnosis of excessive fluid accumulation of fluid in the uterus of a pregnant mare.

Hydroallantois is a rare condition that occurs during the last trimester of pregnancy in primarily pluriparous mares after an otherwise uneventful gestation. Clinical signs include an enormous increase in abdominal size over 10-14 days, due to a rapid accumulation of allantoic fluid(Allen, 1986; Blanchard et al., 1987b; Waelchli and Ehrensperger, 1988). Other clinical signs seen result from the pressure exerted by the excess amount of fluid. Mares may have anorexia, tachycardia, tachypnea, dyspnea, ventral oedema, colic and difficulty in defecating and walking. Horses with advanced cases may show evidence of ventral abdominal hernia or pre-pubic tendon rupture.

Evaluation of the genital tract per rectum reveals a huge, fluid filled uterus and it may be difficult to palpate the foetus. Prognosis for obtaining a live foal is poor and management of the case should be directed at saving the mare’s life (Lofstedt, 1993). Parturition should

be induced to relieve the pressure on the mare's internal organs. Removal of the allantoic fluid slowly by rupture of the allantochorion should be attempted, as should siphoning of the fluid while supporting the mare with intravenous fluids and corticosteroids to prevent shock. Rather than fluid loss causing shock, we believe that the fluid loss removes the pressure on the abdominal vessels and pooling and hypovolemic shock may follow when it occurs to quickly. Oxytocin may be administered to aid in evacuation of the uterine contents, although in mares with uterine inertia, the uterus may not respond to treatment.

Hydrops amnii is an excessive accumulation of amniotic fluid in the amniotic cavity and it has a low incidence in all species(Christensen et al., 2006). Hydrops amnii in the mare is reported less frequently than hydroallantois(Sertich et al., 1994). The normal volume of amniotic fluid in the mare near term is between 3 to 7 L. Hydrops amnii tends to develop gradually over several weeks or months, during the latter half of gestation. The normal amniotic cavity has a direct communication with the digestive system by way of the mouth and anus. The foetus swallows fluid and may keep levels constant as foetal monsters with gut abnormalities often have excessive fluid (8-10 times normal) in the amniotic cavity (hydrops amnii) (Fig 2a and b). Amniotic fluid is composed of saliva and secretions of the nasopharynx of the foetus. Although swallowing by the foetus may play a role in the maintenance of foetal fluid balance, other mechanisms may be important as there is no reported incidence of hydrops conditions with atresia or agangliosis of the digestive system. In cases of hydrops amnii, prognosis for the pregnancy is poor, because abortion and premature delivery are quite common. Fortunately, the prognosis for future fertility is fair to good, because the dam's genital tract usually is normal after termination of the pregnancy.

See pictures on page 30

Management of Hydrops should recognize that in most cases there will be an adverse outcome for the foal regardless of when intervention occurs as well as an adverse outcome for the mare if intervention is delayed significantly. Cleary the urgency of treatment is dictated by the severity of the clinical signs which can vary from an enlarged abdomen in an otherwise normal mare through to a mare with colic, tearing of abdominal musculature, increased heart rate and signs of shock. Mares may present with a sudden change in abdominal size and shape. A rapid increase in abdominal distension results in anorexia, depression, progressive lethargy with difficulty in walking, ventral pitting oedema and dyspnoea. In a normal pregnancy the allantois contains 8 to 15L of fluid and the amnion 3 to 5L, in a case of hydrallantois the allantoic volume can range from 120-220L.

Treatment It is highly unlikely that the mare will be able to sustain the pregnancy to deliver a live foal and so once diagnosed it is a logical decision to terminate the pregnancy to ensure the health of the mare and avoid further complications. Induction is however not without risk.

The aim is to allow the slow and gradual removal of the foetal fluids to allow the mare's vascular system to adapt to the sudden change in abdominal pressure thus avoiding shock with pooling of blood in abdominal vasculature once the fluid is removed. In preparation for induction the tail should be bandaged, the rectum emptied and the perineum cleansed, and a large bore i/v catheter placed to allow rapid volume replacement if necessary. Manual dilation of the cervix and puncturing of the chorioallantois offers the best chance of removing the fluids slowly. The cervix is readily dilated with gentle digital manipulation at most stages of pregnancy. Once the membrane is ruptured foetal fluids will begin to escape, if they do not flow freely then a large bore stomach tube can be used to siphon the

fluid slowly. Often it is best to remove fluids witht a stomach tube as the removal rate can be controlled to some extent. We have had collapse of the mare even after taking more than 30 minutes to remove fluids, so patience appears important.

Once the foetus can be palpated it can be manually extracted, if the foetus is large dystocia may be encountered and care must be taken to avoid cervical trauma. THe foetus will almost always be small in cases of hydrops amnii. Low dose oxytocin (5 iu) can be administered intravenously to induce uterine contraction if necessary, however the enlarged and stretched uterus often does not respond. The foetus may well be alive and the attendants/ owner/veterinary students etc should be warned of this probablility. The foal should be detached from the umbilicus before (if) it is euthanized. The mare should be monitored carefully for retention of fetal membranes which is commonly encountered due to uterine inertia; repeated small doses (5-10 iu) every hour may help.

The prognosis for future breeding of the mare is good with fertility being good and no increased probability of the same problem re-occurring.

Pre-pubic and abdominal wall rupture

A degree of ventral oedema is normal in late gestation (especially in the northern hemisphere where restriction of exercise and boxing of late pregnant mares at night occurs), and the plaque can be up to 10cm deep. This oedema results from the restriction of lymphatic drainage and venous return by the weight of the pregnant uterus. It is important to differentiate this physiological oedema from the inflammatory oedema secondary to tearing of the ventral body wall musculature or pre-pubic tendon.

A breakdown in the body wall of pregnant mares is common in older draft mares(Jackson, 1982; Lofstedt, 1993), but is also has been reported in other breeds. Conditions causing severe distention of the body wall, such as hydrops, twins, severe ventral oedema or trauma, may result in rupture of the pre-pubic tendon, abdominal wall rupture or an abdominal hernia, however, many cases occur with no apparent reason and we have even seen it in a maiden mare. Mares usually present very close to foaling with severe, ventral oedema running cranially from the udder and in many cases involving the udder itself. Unilateral oedema may suggest partial rupture of the pre-pubic tendon or damage to the ventrolateral body wall. Affected mares have difficulty rising and are reluctant to move. Acute progression of either condition may result in severe distress, colic, tachypnea, tachycardia, sweating, internal hemorrhage, shock and death. Prognosis for mare survival was better with non-intervention and when rupture was not associated with hydrops(Ross et al., 2008).

Although the causes of these conditions are similar, the clinical appearance may help differentiate them. A mare with pre-pubic tendon rupture will have an elevated tail head and tuber ischii, due to the lack of ventral support of the pelvis, that results in lordosis and a sawhorse stance. The mammary gland may be shifted cranially from its normal position. Although a mare with an abdominal hernia or rupture may have an enlarged abdomen, her tail head and tuber ischii will be in a normal position.

A diagnosis of pre-pubic tendon rupture or ventral body wall hernia may be difficult to confirm. In heavily pregnant mares, the presence of the foetus often makes palpation of the defect per rectum very difficult and palpation trans-abdominally is usually impossible because of the amount of oedema in the area. In our experience ultrasonography can be useful in identifying body wall defects and herniation of intestine, but the extent of the damage may not be clearly defined until after parturition, when most of the oedema is resolved. On occasion a diagnostic differential is severe oedema in the pre-partum mare. In

cases of rupture the secretions in the mammary gland will commonly be blood stained (Fig 3), while pre partum oedema will not have any. This has important diagnostic significance as exercise is useful in the former condition. Mares suffering from abdominal wall ruptures are best left to provide foals by embryo transfer in the future, however on occasion mares have successfully carried foals to term after a period of rest.

See pictures on page 33

Treatment depends upon the extent of the rupture, the pain experienced by the mare, stage of pregnancy, foetal viability and the value of the mare and foal. Termination of the pregnancy may be the most humane treatment for the mare however, attempts to support the mare until parturition, or a time when the foal is mature enough for parturition to be induced, are realistic approaches (Ross *et. al.* 2008). Mares should be restricted to a large stable, abdominal support (Fig 4) can be applied to support the abdominal musculature however care should be taken to avoid pressure sores. Analgesics and NSAID's should be administered to effect and broad spectrum antibiotics are recommended. Reducing the bulk of the ration and addition of a mild laxative are helpful. The foal should be carefully monitored by serial ultrasonographic examination and milk electrolytes monitored close to term. Further deterioration in the mare's condition or compromise of the foetus will lead to either induction or elective caesarean. Assistance with parturition is always necessary due to the inability to contract the abdomen.

See pictures on page 33

In many cases, due to rapidly changing clinical parameters, the mare gains little from supportive treatment and induction of partition must be performed. Catastrophic body wall tears can occur in these mares at any time and can be life threatening. Assistance with parturition is always necessary due to loss of abdominal pressure. If the foal has passed 315 days of gestation then induction of parturition can be considered. If in the opinion of the veterinarian the mare can survive for 4-5 days then immediately starting her on 100mg dexamethasone phosphate IM daily, for 5 days(Ousey et al., 2006) is a good treatment option. The decision to induce versus immediate abortion/delivery of the foal is not to be taken lightly as catastrophic rupture and death of the mare is not uncommon in mares where delay due to treatment with dexamethasone is recommended.

Repairs have been attempted with prosthetic mesh in small or partial tears. This should only be attempted post-partum and may not be necessary, and further breeding from the mare is not advisable, especially if ET is a possibility.

Uterine Torsion

Uterine torsion in the mare occurs late in gestation (>8 months), more frequently in draft breeds than light horses and is not usually associated with parturition, unlike in the cow. A low incidence of uterine torsion in mares is attributed to the sublumbar attachment of the ovaries and the dorsal insertion of the broad ligaments in the uterus. The causes of uterine torsion in the mare are not well defined, but include factors such as vigorous foetal movements, sudden falls, relative foetal oversize, diminished volume of foetal fluids, lack of tone in the pregnant uterus, long mesometrium and the presence of a large, deep abdomen. Clinical signs are related to the severity of the torsion and include signs of abdominal pain

such as restlessness, sweating, anorexia, frequent urination, sawhorse stance, looking at the flank and kicking the abdomen. Signs may present for a variable duration (from few hours to 3 days or more) and they can mimic those of the early stages of parturition.

The uterus may twist 90-540^0 on its long axis and when viewed from behind has an equal probability of twisting clockwise or anti-clockwise (Fig 5). In the mare, the twist typically involves the uterine body, not the cervix or the vagina, as occurs in the cow. If the torsion is less than 180^0 and blood flow to the uterus is not compromised, correction may not be required. The mare may show signs of shock if uterine rupture has occurred. Diagnosis is made by clinical signs and palpation by rectum of the gravid uterus; vaginal examination is only occasionally diagnostically useful. Palpation per rectum reveals tense broad ligaments, spiraling in the direction of the torsion. If the torsion is counterclockwise (as viewed from the rear), the left broad ligament will be taut and be felt to traverse under the uterus, while the right broad ligament will stretch dorsally over the distended uterus. The opposite will be present in a clockwise uterine torsion. The small colon undergoes a variable amount of constriction, due to the compressive forces of the displaced broad ligaments and may impede the ability of the examiner to perform a complete rectal examination. In such cases, it is difficult to evaluate foetal viability or uterine integrity and it may even be impossible to determine which direction the uterus is rotated. Ultrasonography has not been useful for diagnosis of uterine torsion in our experience; however it has been useful for determining if the foetus is still alive and also to evaluate placental attachment. In cases were the foetus has already died management is different and frequently more aggressive.

See pictures on page 34

The prognosis for cases of equine uterine torsion depends on the degree of the circulatory disturbance resulting from involvement of the broad ligaments and uterine vessels. When the foetus is alive and the uterine wall is not severely congested and oedematous and treatment is prompt, the prognosis for maternal survival and the birth of a normal, live foal at term is good. A recent large retrospective study showed increased survival rates for both mares and foals when the uterine torsion occurred less than 320 days of gestation compared to a later occurrence(Chaney et al., 2007). Overall mare survival was 84% (53/63). When uterine torsion occurred at < 320 days gestation, 97% (36/37) of mares survived compared to 65% (17/26) survival when uterine torsion occurred at ³ 320 days gestation. Overall foal survival was 54% (29/54). When uterine torsion occurred at < 320 days gestation, 72% (21/29) foals survived compared to 32% (8/25) when uterine torsion occurred at ³ 320 days gestation. Thirty mares were discharged from the hospital carrying a viable foetus following uterine torsion correction and 25/30 (83%) of these mares delivered live foals that survived beyond the neonatal period(Chaney et al., 2007).

When uterine torsion is diagnosed at parturition correction can be performed by transcervical manipulation of the fetus in the standing patient. Rocking or twisting the fetus against the direction of the torsion will correct over 80% of torsions presented at this stage. However, in mares not many uterine torsions present at term.

Rolling of an anaesthetised mare can be used to correct torsion but caution should be taken near term because of a risk of uterine rupture. The mare should be rolled in the direction of the torsion so that the mare 'catches up' with the uterus. The procedure may need to be repeated several times to achieve correction. The risks of uterine rupture and subsequent abortion should be explained to the owner prior to rolling.

Surgical correction may be performed by either standing flank or midline laparotomy. In quiet mares, 6 weeks or more from term, with an uncomplicated torsion a standing flank laparotomy is the treatment of choice. The presence of a live fetus greatly facilitates the detorsion manipulations. In mares close to term an incision in both flanks may be necessary. Ventral midline laparotomy is the method of choice in late term mares with suspected concurrent gastrointestinal lesions and if a caesarean section is appropriate it can be performed at the same time.

Uterine rupture (pre-parturient)

Uterine rupture usually occurs in the peri-partum period as a result of manual intervention for dystocia or foetotomy or possibly because of violent intra-partum movement. However, in cases of uterine torsion(Wichtel et al., 1988) or hydrops(Honnas et al., 1988) and in occasional idiopathic cases, the uterus can rupture before term. When the uterus ruptures before term, the mare may not show much pain and if the foetus escapes into the abdomen and hemorrhage is not severe, uterine involution may occur without external signs.

Diagnosis of uterine rupture may be facilitated by palpation and ultrasonography of the uterus per rectum, by foetal examination, abdominal centesis and a history of moderate to severe abdominal pain during the last trimester of pregnancy. Once the uterus has ruptured and its contents have escaped, the uterine wall may feel thickened and corrugated, because the uterus contracts and begins to involute quite quickly. The site of rupture may be equally difficult to demonstrate by trans-rectal ultrasonography. However, trans-abdominal ultrasonography may reveal the presence of the foetus on the abdominal floor with excessive free abdominal fluid.

Placental separation and placentitis related detachment of a significant portion of the allantochorion from the endometrium constitutes an emergency for the foal owing to failure of adequate exchange of oxygen, carbon dioxide and nutrients. Premature placental separation may occur in two forms in pregnant mares: acutely at parturition and more chronically during gestation, usually associated with placentitis. Chronic placentitis may be recognized by trans-abdominal ultrasonography, however rectal ultrasonography is necessary to examine the cervix region in cases of ascending placentitis (Fig 6a-d). Chronic ascending placentitis or oedema may result in separation and thickening of the placenta over the cervical region.

See pictures on page 36 - 37

Placentitis is the most common cause of late-term pregnancy loss and, whilst many cases are amenable to treatment, effective treatment is not always possible. The main reason for this ineffective treatment is an inability to diagnose the condition early. The usual cause of the placentitis (>90% of cases) is an ascending infection that enters the uterus via the cervix. The most common pathogens isolated from placental infections are the common reproductive pathogens such as *S.zooepidemicus* and *E. Coli(Macpherson, 2005; Macpherson and Bailey, 2008)*. Mares with placentitis may not develop clinical signs until well into the disease process. Typically mares suffering from placentitis are older than 12 years of age and some mares are known to be at risk for placentitis from previous history or poor perineal conformation.

Clinical signs

The clinical signs of placentitis are variable and include vulval discharge, mammary development, lactation and cervical relaxation. Mares with a vulval discharge in late pregnancy should be given a thorough clinical examination including examination of the udder and a speculum examination of the vagina and cervix. However, it is important to understand that vulvar discharge is often not present. This may be because the discharge is produced in such small quantities or it is not present. Because most placental infections are ascending in aetiology speculum examination of mares with a purulent discharge usually reveals the exudates to originate from the cervix. It is very important to identify any discharge early and signs may include accumulated discharge on the vulva, tail hairs and legs. Owners should be instructed to monitor late term pregnant mares for these signs.

The most common presenting sign of placentitis is premature mammary development and lactation (see below). Premature mammary development may indicate impending abortion due to a variety of infectious and non-infectious causes including umbilical cord torsion and twin pregnancy. Vulvar discharge is a very inconsistent clinical finding; it is likely that a discharge is often present in affected mares, but it may be produced in such small quantities that it is easily missed.

Diagnosis

Transrectal and transabdominal ultrasound are both useful tools to investigate the condition. When presented with a mare with clinical signs transrectal ultrasound should be performed as a routine and the combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) measured. Subclinical disease may result in subtle ultrasonographic changes that are not easily distinguished from normal findings.

Transrectal ultrasonography in late-gestation mares also allows for evaluation of foetal activity, foetal fluid character, foetal orbit measures and subjective amniotic evaluation. The combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) is measured with a 5–10 MHz linear transducer at the ventral aspect of the uterine body as the dorsal aspect may be edematous in normal late gestation mares. The probe should be positioned just cranial to the cervix and then moved laterally until a major uterine vessel is visible at the ventral aspect of the uterine body (Fig 7). The area between the uterine vessel and the allantoic fluid represents the combined uteroplacental unit; at least three measurements should be taken and averaged.

Normal values for CTUP

Month	Gestational Day	CTUP
9	241-270	<7 mm
10	271-300	<8 mm
11	301-330	<10 mm
12	331-360	<12 mm

(Renaudin et al., 1997; Renaudin et al., 1999)

See pictures on page 38

Transabdominal ultrasound assessment of the foetus is time consuming and requires patience along with a good equipment and knowledge of the normal parameters. Foetal

wellbeing can be assessed through ultrasonographic measures of foetal heart rate, activity and size. Periods of inactivity are observed in fetuses of all ages, but are more common in late gestation, when they usually last ≤10 min. Detection of prolonged inactivity or hyperactivity during rectal palpation or ultrasound is suggestive of a poor foetal outcome. Repeated examinations may be necessary due to the variation in foetal heart rate and activity over time.

Placentitis has been demonstrated to cause a marked increase in CTUP. Measures above the normal ranges have been associated with pending abortion and placental pathology. While an elevated CTUP may suggest pathology mild increases may require confirmation by the presence of other clinical signs such as placental separation. Measurements in these cases are overruled by the presence of separation which is strongly indicative of an ascending placental infection. Conversely, not all mares suffering from an ascending placentitis show placental thickening on ultrasonographic evaluation.

Speculum examination of mares with a purulent discharge usually reveals an exudate originating from the cervix; this will also enable swabbing of the cervix in order to determine the aetiological agent(s) and their sensitivity pattern. In addition progestin and total oestrogen concentrations can be measured to assess the health of the foeto-placental unit and mammary electrolytes can be used to predict readiness for birth.

Milk electrolytes:

- calcium, sodium and potassium
- Rapid pre-partum increase in calcium >10mmol/L
- Relative concentrations of sodium and potassium invert with potassium > sodium in the last few days of gestation
    - Changes generally indicate foetal maturity
- Mares with abnormal placentas show precocious mammary gland development and electrolyte changes
    - Premature rise in calcium of >10mmol/L
    - Sodium and potassium values essential for interpretation as calcium is unreliable in many cases

Hormone assays:

- Progestins and oestrone sulphate
- Serial blood samples are required to detect abnormal trends
    - Decreasing, or consistently low progestin concentration in the last month of pregnancy associated with abortion
    - Premature rise in progestins may be an indicator of foetal stress
    - Oestrone sulphate concentration demonstrates foetal viability.
    - A sharp decline in oestrone sulphate may reflect a compromised fetus

Treatment

Once placentitis is suspected, the aim of the clinician is to contain the infection, reduce the inflammation and encourage myometrial quiescence.

Commonly used drugs include:

- Broad-spectrum antibiotics
    - After culture and sensitivity results. Many clinicians use a penicillin and gentamicin combination given intravenously for the first five days. The change to orally administered trimethoprim sulfa. It is difficult to know how long to maintain mares on therapy and many clinicians maintain treatment up to foaling.
- Anti-inflammatory drugs
    - Premature delivery may be due to inflammation of the placenta rather than foetal infection. Therefore it is important to place these mares on drugs such as flunixin meglumine, ketoprofen or phenylbutazone.
- Progesterone
    - Supplemental progesterone or synthetic progestagen treatment is usually recommended at high levels. For example use of altrenogest at a dose rate of 0.088mg/kg orally every 24 hours
- Tocolytic drugs
    - Clenbuterol may help maintain myometrial quiescence as mares with placentitis appear to have increased uterine motility (McGlothlin et al., 2004)
- Pentoxifylline
    - This drug can increase perfusion through capillaries and has anti-inflammatory/anti-cytokin properties. Recent work has shown that whilst treating mares with placentitis with a combination of Altrenogest, pentoxifylline and trimethoprim sulfa successfully prolonged gestation with more mares delivering live foals in an experimental model of placentitis.

"The objective was to determine if long-term treatment with trimethoprim sulfamethoxazole (antimicrobial), pentoxifylline (anti-inflammatory/anti-cytokine) and altrenogest (synthetic progestin), would improve pregnancy outcome in mares with experimentally induced placentitis. Seventeen normal, pregnant pony mares were enrolled in the study at 280-295 d of pregnancy. Placentitis was induced in all mares by intra-cervical inoculation of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus (10(7) CFU). Five mares served as infected, untreated control animals (Group UNTREAT). Twelve mares (Group TREAT) were infected and given trimethoprim sulfamethoxazole (30 mg/kg, PO, q 12h), pentoxifylline (8.5 mg/kg, PO, q 12h) and altrenogest (0.088 mg/kg, PO, q 24h) from the onset of clinical signs to delivery of a live foal or abortion. Blood samples were cultured from all foals at delivery and fetal stomach and thoracic contents were obtained for culture from dead fetuses. More mares in Group TREAT delivered viable foals (10/12; 83%; P < 0.05) than mares in Group UNTREAT (0/5; 0%). Ten of 12 foals (83%) in Group TREAT had negative blood cultures at birth. All foals in Group UNTREAT (5/5; 100%) had positive cultures from one or more samples (blood, stomach contents, and thoracic fluid). Bacteria were recovered from uterine culture samples in both groups. Streptococcus equi subsp. zooepidemicus was the predominant organism recovered from fetal/foal or mare culture samples. The authors inferred that administration of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest may improve the viability of foals from mares with experimentally induced placentitis(Bailey et al., 2010)

The treatment strategy is aimed at controlling the infection, reducing the associated inflammation and promoting myometrial quiescence. Before culture and sensitivity results

are available broad spectrum antibiotics should be instigated. Trimethoprim Sulfadiazine (30mg/kg, b.i.d.) or a combination of procaine penicillin (15mg/kg; b.i.d.) and gentamycin (6.6mg/kg, s.i.d.) have been demonstrated to penetrate placental and foetal tissues. Cases of fungal placentitis are an additional challenge and their treatment is beyond the scope of this article.

Progestins are advocated to promote uterine quiescence and perhaps improve oxygen perfusion of the placenta and altrenogest has been demonstrated to prevent prostaglandin induced abortion. Tocolytics such as isoxsuprine and clenbuterol have been shown to cause short term uterine relaxation however they may not be of practical use in this scenario. Non-steroidal anti-inflammatories (NSAID's) such as flunixin meglamine and phenylbutazone are obvious choices to reduce inflammation and prevent prostaglandin-mediated abortion. Other agents have been investigated including pentoxifylline, which has been shown to down regulate pro-inflammatory cytokines and reduce the mortality rate in premature human infants with sepsis. Acetylsalicylic acid (aspirin) has been demonstrated to reduce the incidence of preeclampsia in women with abnormal placentation and has been demonstrated to improve uterine blood flow in the mare. Mares should be monitored using transrectal ultrasonography during therapy. Treatment in advanced cases is often unrewarding and abortion, stillbirth or the pre-term delivery of a severely compromised premature foal is commonly encountered. Foetal hear rates of < 60 a one or two months from expected parturition is a bad prognostic indicator. However if these cases are caught early the clinician may be able to stop or slow the disease process for long enough to ensure the birth of a viable foal. It is important to treat any live foal born, premature or not, as high risk and manage accordingly. Post abortion/delivery the mare should be managed in the same fashion as a mare with post-foaling metritis. Once a mare has had a case of placentitis she should be considered a high risk and should be managed to prevent recurrence. Perineal conformation should be critically assessed and a Caslick's procedure performed if there is any doubt. Screening by strategic monitoring of CUPT will enable early detection in future pregnancies.

Prolonged gestation

Gestation usually lasts for 310-374 days, but normal pregnancies can be as long as 399 days(Vandeplassche, 1980). We have seen numerous cases of confirmed gestation longer than 400 days with one being born alive at 432 days. Foals born from such pregnancies are not usually oversize and do not predispose the mare to dystocia(Vandeplassche, 1980). Typical foals are small with a domed head and long tail and mane. The duration of gestation is partly controlled by nutrition and the genotype of the foal, but mares themselves may also control the duration of gestation. Based on the finding that average gestational duration's were longer for mares bred earlier in the season, Ginther suggested that mares may be able to make limited adjustments, so that their foals are born with an optimal chance for survival(Ginther, 1992). The physiologic control of this phenomenon appears to be related to photoperiod(Hodge et al., 1982).

Owners and farm managers are often concerned about pregnancies extending beyond the expected parturition date and begin to exert pressure on the veterinarian to induce foaling. If no mammary development has occurred and foetal well-being has been assessed by ultrasonography, this practice should be strongly discouraged even if the duration of gestation is longer then one year. We have seen numerous cases of foals from induction of parturition after a prolonged gestation where foetal immaturity resulted in an inability to survive for more than 24-48 hours.

Patience and waiting for parturition to be initiated without intervention are indicated in most cases of prolonged gestation; however, fescue toxicosis also causes prolonged gestation and very large foals and may well require specific intervention(Green et al., 1991). Tall fescue (*Lolium arundianceum*) infected with the endophytic fungus *Neotyphodium coenophialum*, (previously named *Acremonium coenophialum*) when ingested by pregnant mares can have serious deleterious effects on the latter stages of equine pregnancy. Fescue toxicosis causes not only prolonged gestation, but also dystocia and hypogalactia. In affected foals, toxicosis causes dysmaturity and poor chances of survival.

Placentas from affected mares are thick and oedematous and placental oedema and premature separation of the chorioallantois have both been observed with ultrasonography.

The disease does not seem to be prevalent in Australia.

POST-PARTURIENT PROBLEMS

An interesting article appeared in the Journal of Veterinary Emergency and Critical care looking at reasons for admission and diagnostic accuracy in mares > 3 year old that were admitted for emergency treatment with 30 days of foaling(Dolente et al., 2005). The tables below summarises the diagnosis and the time from parturition and admission and the time of duration of the problem(Dolente et al., 2005).

Reference range	All	Urogenital hemorrage	Uterine tear	Metritis	Large colon Volvulus	Small intestinal disease	Caecal disease	Small colon disease
Parturition to admission (hours)	133	35	58	87	224	278	51	153
Duration of signs (hours)	10	15	23	22	14	8.8	22	44

Reason for admittance and comments are provided in the table below(Dolente et al., 2005).

Reason for admission	% of diagnoses	Comment
Urogenital hemorrhage	16.6% (27/163)	11 Broad ligament haemorrhage, 5 Intraluminal 6 haemoperitoneum
Large colon Volvulus	16.6% (27/163)	
Metritis	8% (13/163)	70% had dystocia
Small intestinal disease	7.4% (12/163)	10 SI Volvulus
Uterine tear	5.5% (9/163)	Luekopaenia (P<0.001)
Caecal disease	6.1% (10/163)	6 Rupture, impaction
Nephrosplenic entrapment	5.5% (9/163)	
Small colon disease	3.1% (5/163)	4 trauma
Colitis	3.1% (5/163)	
Large colon displacement	3.1% (5/163)	
Rectovaginal trauma	2.5% (4/163)	Mostly prolpases
No diagnosis	17.8% (29/163)	

Readers should be aware that this is a referral hospital population so may not reflect what is actually happening on the breeding farms.

Peri-vaginal hematomas and abscesses

Intra-pelvic perivaginal bleeding that results in perivaginal hematoma formation is not difficult to diagnose with ultrasonography. Large hematomas can be drained 2-3 days post-partum, after clot formation has occurred. If hematomas do not regress or do not become progressively firm, abscessation should be suspected.

Occasionally peri-vaginal or abdominal rather than retroperitoneal abscesses may be confirmed by ultrasonography and by needle aspiration. The abscess should be incised and drained if not abdominal, however on occasion we have drained abscesses into the uterus. Occasionally, large intra-pelvic hematomas may leave permanent lumps of scar tissue that are palpable ventrally in the pelvic canal.

Peri-parturient haemorrhage

Haemorrhage from the middle uterine, utero-ovarian or, less frequently, external iliac arteries is a significant cause of peri-partum colic syndrome and death, usually in older, multiparous brood mares. Haemorrhage from these vessels is often fatal, especially if the haemorrhage is into the abdominal cavity. The incidence of peri-parturient haemorrhage increases with age, however young mares may be affected(Arnold et al., 2008). Although it may occur before, during, or after parturition, it is most common and clinically significant during or within the first 24 hr. post-partum. Dystocia is not always associated with the haemorrhage and it is often seen in mares after an apparently problem free delivery. Fatal haemorrhage has also been reported after peri-parturient accidents such as uterine torsion, uterine tears or uterine prolapse.

The clinical signs associated with peri-parturient haemorrhage depend on the site and severity of the haemorrhage and whether bleeding is contained within the broad ligaments or has escaped into the abdomen. Mares that bleed into the broad ligaments will exhibit variable signs of abdominal discomfort as a result of tension on the ligament and uterine serosa. Sometimes these signs may be overlooked as mares often show some abdominal discomfort associated with uterine contractions immediately post-partum. As blood loss and broad ligament distention increase, signs of abdominal pain, sweating, weakness, tachycardia, tachypnea, ataxia and pale mucous membranes become more apparent. Rupture from the broad ligament or continued blood loss may lead to rapid onset of haemorrhagic shock. The course of clinical signs may be extremely rapid in cases in which complete rupture occurs and haemorrhage occurs directly into the abdomen. Death often ensues within minutes to hours after the appearance of the first signs of discomfort. In other cases, mares may have exhibited mild signs initially (associated with containment of haemorrhage within the broad ligament), only to collapse later. Mares suffering from uterine haemorrhage are sometimes just found dead. The time of onset of clinical signs appears to be related prognosis with mares that do not show signs in the first 12-24 hours having a better prognosis for long term survival. In addition to the above, sometimes haemorrhages contained within the broad ligament, may go undetected until a prebreeding examination of the reproductive tract is performed. Mares that show persistent signs of abdominal pain or blood loss soon after parturition, should be evaluated by ultrasonography and only gentle palpation of the uterus and broad ligaments. Both rectal and trans-abdominal ultrasonography are useful in the diagnosis and management of cases of peri-parturient haemorrhage in the mare (Fig 8a-c).

See pictures on page 45

Treatment of mares with peri-parturient haemorrhage depends on a variety of factors, such as heart rate and time post partum the problem was first identified, value of the mare, ability to transport the mare.

Mares identified later than24 hours after foaling with hear rates less than 65 bpm may only require box rest and conditions to keep them calm. The treatment of mares with uterine artery haemorrhage is intended to provide analgesia and sedation, aid in haemostasis, restore cardiovascular volume, and provide antimicrobial prophylaxis Mares with significant signs of hypovolaemic shock can be treated aggressively with IV fluids, hypertonic saline, blood transfusions, etc as long as blood pressure is not elevated enough to dislodge any clots that have formed. Aminocaproic or tranexamic acid that are reported anti-fibrinolytic agents can administered to aid in clot stabilisation. We use a 50 gm loading dose of aminocaproic acid followed by 25 gm BID. Flunixin, butorphanol and xylazine are all useful in pain management.

Naloxone and IV formalin have been advocated but there does not appear to any scientific evidence to support either treatment.

Broad spectrum antibiotics are necessary to help prevent peritonitis of abscessation of the blood clot.

A recent study in the USA from a referral hospital suggested the prognosis for survival was quite good as 61 of 73 mares (84%) survived (Arnold et al., 2008), however this study only considered mares that were referred and did not include mares that died or mares considered at risk to travel and mares considered not necessary to refer as they had a good chance of surviving without therapy.

With reference to prevention or recognition of risk of haemorrhage pre-foaling an article from Japanese workers was interesting. Histologically, the arterial wall adjacent to the rupture showed atrophy of smooth muscle cells with fibrosis of the *tunica media* and disruption and/or calcification of the internal elastic lamina(Ueno et al., 2010)

> *REASONS FOR PERFORMING STUDY: Broad ligament haemorrhage in peripartum mares is a life-threatening disease and there are few reports on the aetiology and pathogenesis of broad ligament haematoma. OBJECTIVES: To obtain information regarding the sites for the early diagnosis and pathogenesis of broad ligament haematoma of mares. METHODS: Thirty-one mares that died of broad ligament haematoma peripartum were examined pathologically for bleeding sites. The arterial distribution of 5 young mares with several parities served as negative controls. RESULTS: Age and/or multiparity were the predisposing factors for the disease. Arterial injuries were most commonly observed in the uterine artery (24 of 31 mares). Among these, the proximal uterine artery that lies within 15 cm of the bifurcation of the iliac artery was the most frequent site for rupture (18 mares). The lesions occurred preferentially at the bifurcations, lateral part of curvatures and abrupt flexures of the artery. The morphology of the injuries was classified into 3 types: ruptures with and without longitudinal fissures, and transections. Histologically, the arterial wall adjacent to the rupture showed atrophy of smooth muscle cells with fibrosis of the tunica media and disruption and/or calcification of the internal elastic lamina. CONCLUSIONS: Arterial injuries that led to broad ligament haematoma in peripartum mares occurred most frequently in the proximal uterine artery, and atrophy of smooth muscle cells with fibrosis of the arterial wall was as one of the predisposing factors in aged and multiparous mares. POTENTIAL RELEVANCE: Monitoring small aneurysms, mural tearing, medial fibrosis at the proximal uterine artery by transrectal echography could provide useful information for the early diagnosis and possible prevention of broad ligament haematoma of peripartum mares*

Uterine prolapse

Uterine prolapse is not very common in mares. The prognosis depends on if the uterine artery tears or not. If it does not tear the prognosis is good. If it does the mare will often die of hypovoaemic/caridiovasuclar shock. Of course other factors will mitigate the prognosis, such as concurrent prolpase and damage of intestine or bladder, concurrent uterine etc.

There is an association of uterine prolapse and dystocia and also conditions causing tenesmus (vaginal trauma and retained foetal membranes). In addition abortion, twins and increasing age are factors as well.

Most prolapses occur immediately, however some have occurred hours later.

Management should involve timely replacement after cleaning (Fig 9).

If the mare is distressed then general anaesthesia should be performed for replacement. If the uterus can be replaced standing then consider an epidural. We prefer the following mixture: xylazine (~0.17mg/kg bwt;), lidocaine (~0.15 mg/kg bwt; ~3mL of 2% lidocaine solution) and ~6 mL of Lactated Ringer's solution to a volume of 10 mL. The volume administered as an epidural in the first intercoccygeal space is titrated based on the size of the mare. Large mares (>600 kg) may receive the full 10-mL dose and smaller mares (450-500 kg) receive between 7-8 mL.

The epidural may not be necessary for replacement but tenesmus is not uncommon after replacement. Consider a caslick as well.

The technique for replacement that has worked well for us to use a clean sheet or extra strength garbage bag (cheap ones will tear) to lift the uterus. This is best done by support staff with the veterinarian supporting the weight and replacing the uterus. No protection to the uterine surface allows fingers to perforate the tissues.

If possible removing the placenta at the time of replacement will decrease straining after replacement and improve cleanliness. Careful identification of correct replacement (both uterine horns not invaginated) also decreases post replacement distress and tenesmus.

If uterine atony is suspected then small doses of oxytocin (10 IU) and calcium (50-250 mL of 20% Calcium borogluconate) can be administered.

It is not uncommon for mares to either get pregnant and suffer early embryonic death or not get pregnant in the same breeding season as the prolapse occurred.

See pictures on page 47

Uterine rupture

Uterine rupture is associated most commonly with either foetotomy or assisted delivery, however it may be associated with a normal delivery. Complications that may be associated with uterine rupture include visceral herniation, peritonitis, haemorrhage, shock, and death.

The more common place for rupture is the dorsal surface of the uterine body but the tears can occur anywhere and are not uncommon at the tip of the horn.

Immediate diagnosis is difficult unless they can be felt during a routine post foaling internal examination.

Diagnosis is usually suspected when the mare is depressed and inappetant a day or more from foaling. Occasionally mares may show colic.

Commonly a complete blood examination will reveal a leukopaenia.

Ultrasonography and abdominocentesis are the two extremely useful diagnostic tests. Other modalities such as laparoscopy are also occasionally beneficial depending on location of the tear.

Medical management although possible is dangerous if the mare is valuable and the tear is not small and dorsal.

Dorsal tears may on occasion be sutured by hand through the vagina and uterus.

In general it is best to do an exploratory laparotomy and identify the tear(s) and suture them properly.

This technique also allows concurrent flushing of the abdomen. If significant contamination has occurred a technique that sometimes is used at our hospital is to resect the omentum and place a drain off ventral midline (a chest drain works well). The abdomen can be lavaged by infusing one or two 5 L bags of Hartmans' with antibiotics and the siphoning them off again after hand-walking the mare to mix the fluids with the abdominal contents.

The prognosis for mares with uterine ruptures is related to size and location of the tear and to speed of recognition and appropriate treatment.

Retained placental membranes (RFM)/ Metritis-Endotoxemia-Laminitis syndrome

The foetal membranes are usually expelled 30 min to 3 hours after parturition. Horses in a natural environment may retain foetal membranes in the uterus for up to 24-48 hours without complications. These mares may produce a foal the same time the following year without treatment, which suggests that treatment is not always necessary. In an intensive management environment, mares may experience complications (endometritis, metritis, laminitis and even death) that are related to retention of the foetal membranes 8 hr. or less. The percentage of post-parturient mares with retained foetal membranes is believed to range from 2-10%(Threlfall, 1993; Vandeplassche et al., 1971). The probability of retained placenta increases after dystocia, probably as result of trauma to the uterus or myometrial exhaustion. Disturbance of the normal uterine contractions at parturition also might make retained placenta more likely. Retention is particularly likely if served placentitis was present. Placental retention is more common in the non gravid uterine horn, perhaps because of a progressive increase in the degree of placental folding and attachment from the gravid to the non gravid horn. Partial placental retention is also more likely to occur in the non gravid uterine horn(Perkins and Frazer, 1994) because the chorioallantoic membrane is thinner, resulting in easier tearing (Figure 10a and b). Ultrasonography can be used to visualize small pieces of retained foetal membranes in a post-partum mare, as they are typically surrounded by fluid.

A variable portion of the placenta may be exposed through the vulvar opening. Occasionally, the veterinarian is alerted to the possibility of retained foetal membranes, when no placenta is found after foaling. Aseptic intrauterine examination may reveal the presence of the placenta in the uterine cavity. Alternatively, part of the placenta may remain in the uterus and continue to initiate mild straining or colic after most of the placenta has been removed. Not uncommonly, foetal membranes may be found days later when the mare has signs of discharge. Sequel of retained placenta vary from none to the development of toxic metritis, septicemia or endotoxemia, laminitis and death(Blanchard et al., 1987a) or uterine prolapse. Severe toxic metritis and laminitis after dystocia are believed to result from damage to uterine lining that subsequently promotes absorption of endotoxins associated with

the common bacterial proliferation in the post partum mare. In patients with toxic metritis after dystocia and retained placenta, the uterine wall becomes thin and friable or even necrotic. Absorption of bacteria and bacterial toxins probably follows disruption of the endometrium and precipitates the peripheral vascular changes that lead to laminitis(Blanchard et al., 1987a).

On occasion foetal membranes may be detected with ultrasonography, days or even weeks after foaling. In addition, ultrasonographic examination will provide information regarding uterine involution and the presence of fluid within the uterine lumen (see above).

See pictures on page 49

Management of mares with RFM can make a difference to her future breeding career and if endotoxin absorption is possible, then potentially her life.

Multiple treatments with 20 IU units oxytocin is a treatment we recommended to start at about 3 hours after foaling. Failure to dislodge the membranes by 8 hours (guidelines only as 8 hours does not seem that important if it is 3 am) is an indication to begin more aggressive therapy. The veterinary visit for RFM will usually involve lavage and traction. Failure to remove membranes is not considered poor a treatment by the veterinarian (even if the client does not agree) rather IV oxytocin and IV calcium borogluconate(LeBlanc, 2008) can be given with good results. The mare is then placed on systemic antibiotics and non steroidal anti-inflammatory treatment.

Colic

There are a variety of post partum associations and colic. Large colon torsion may be associated with post partum mares having more abdominal space. Occasionally we see this condition on some farms later in the year when the grass has mostly been eaten of the farm pastures and the mares are on pellets. Placing mares on ad-libertum hay has been responsible for eliminating those problems.

Small intestine torsion, caecal rupture, nephrosplenic entrapment and small intestinal trauma are all known associations with post partum mares.

Mares with colic postpartum should be managed as any other horse with colic.

If pain persists and it is likely that the colic is of gastrointestinal origin (as distinct from middle uterine artery haemorrhage) then surgery should be performed if appropriate.

Prolapses

Prolapses of the bladder with or without tearing are not common post foaling problems, however we do see them. A prolapsed bladder during foaling is difficult to handle without anaesthesia and hindlimb suspension as the straining of foaling continues to re-prolapse the bladder.

Prolapses of the bladder may occur through vaginal tears or though the urethra.

Occasionally it is possible to repair a ruptured bladder post partum by prolapsing it through the urethra, but ventral midline or paramedian approaches are often more rewarding.

Prolapse of the rectum after or during parturition often has a bad prognosis as tearing of the mesocolic artery to the terminal rectum can occur. When the rectum is repositioned the mare may show signs of endotoxin absorption or may not show any abnormal clinical signs for 24-48 hours. If there is suspicion of a potential for rectal devitilisation after prolapse then re-examination at 12-24 hour intervals is recommended. When the rectum feels sticky and very dark blood is adherent on the glove when withdrawn, then the rectum is irreversibly damaged. We have seen this change occur as long as 4 days after foaling.

The apparent amount of rectum that prolapsed is not indicative of the potential of the rectum to have ischaemic perfusion problems.

REFERENCES

1. Allen, W. E. 1986. Two cases of abnormal equine pregnancy associated with excess foetal fluid. Equine. Vet. J. 18:220-222.
2. Arnold, C. E., M. Payne, J. A. Thompson, N. M. Slovis, and F. T. Bain. 2008. Periparturient hemorrhage in mares: 73 cases (1998-2005). J Am Vet Med Assoc 232:1345-1351.
3. Bailey, C. S., M. L. Macpherson, M. A. Pozor, M. H. Troedsson, S. Benson, S. Giguere, L. C. Sanchez, M. M. Leblanc, and T. W. Vickroy. 2010. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. Theriogenology 74:402-412.
4. Barber, J. A. and M. H. Troedsson. 1996. Mummified fetus in a mare. J Am Vet Med Assoc 208:1438-1440.
5. Blanchard, T. L., R. G. Elmore, D. D. Varner, M. C. Garcia, J. A. Orsini, and R. S. Youngquist. 1987a. Dystocia, toxic metritis and laminitis in mares. Proc. AAEP 33:641-648.
6. Blanchard, T. L., D. D. Varner, A. M. Buonanno, J. E. Palmer, T. O. Hansen, and T. J. Divers. 1987b. Hydrallantois in two mares. J. Equine. Vet. Sci. 7:222-225.
7. Chaney, K. P., S. J. Holcombe, M. M. LeBlanc, J. G. Hauptman, R. M. Embertson, P. O. Mueller, and W. L. Beard. 2007. The effect of uterine torsion on mare and foal survival: a retrospective study, 1985--2005. Equine Vet J 39:33-36.
8. Christensen, B. W., M. H. Troedsson, T. A. Murchie, M. A. Pozor, M. L. Macpherson, A. H. Estrada, N. A. Carrillo, R. J. MacKay, G. D. Roberts, and J. Langlois. 2006. Management of hydrops amnion in a mare resulting in birth of a live foal. J Am Vet Med Assoc 228:1228-1233.
9. Dolente, B. A., E. K. Sullivan, R. Boston, and J. K. Johnston. 2005. Mares admitted to a referralhospital for postpartum emergencies: 163 cases (1992-2002). J Vet Emerg Crit Care 15:193-200.
10. Ginther, O. J. 1992. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin.
11. Green, E. M., W. E. Loch, and N. T. Messer. 1991. Maternal and fetal effects of endophyte fungus-infected fescue. Proc. AAEP29-44.
12. Hodge, S. L., J. L. Kreider, G. D. Potter, P. G. Harms, and J. L. Fleeger. 1982. Influence of photoperiod on the pregnant and postpartum mare. Am J Vet Res 43:1752-1755.
13. Honnas, C. M., M. S. Spensley, S. Laverty, and P. C. Blanchard. 1988. Hydramnios causing uterine rupture in a mare. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:334-336.
14. Jackson, P. G. 1982. Rupture of the prepubic tendon in a shire mare. Vet Rec 111:38.
15. LeBlanc, M. M. 2008. Common peripartum problems in the mare. J Equine Vet Sci 28:709-715.
16. Lofstedt, R. M. 1993. Miscellaneous diseases of pregnancy and parturition. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 596-603. Lea & Febiger, Phiadelphia, London.

17. Macpherson, M. L. 2005. Treatment strategies for mares with placentitis. Theriogenology 64:528-534.
18. Macpherson, M. L. and C. S. Bailey. 2008. A clinical approach to managing the mare with placentitis. Theriogenology 70:435-440.
19. McCue, P. M., D. K. Vanderwall, and E. L. Squires. 1997. Fetal Mummification in a Mare. J Equine. Vet Sci 17:267-269.
20. McGlothlin, J. A., G. D. Lester, P. J. Hansen, M. Thomas, L. Pablo, D. L. Hawkins, and M. M. LeBlanc. Alteration in uterine contractility in mares with experimentally induced placentitis. Reproduction 127[1], 57-66. 2004.
21. Ref Type: Journal (Full)
22. Meyers, P. J. and D. D. Varner. 1991. Abortion of a mummified fetus associated with short uterine body in a mare. J Am Vet Med Assoc 198:1768-1770.
23. Ousey, J. C., M. Kolling, and W. R. Allen. 2006. The effects of maternal dexamethasone treatment on gestation length and foal maturation in Thoroughbred mares. Anim Reprod Sci 94:436-438.
24. Perkins, N. R. and G. S. Frazer. 1994. Reproductive emergencies in the mare. Vet Clin North Am Equine Pract 10:643-670.
25. Renaudin, C. D., M. T. Troedsson, and C. L. Gillis. 1999. Transrectal ultrasonographic evaluation of the normal equine placenta. Equine Vet Educ. 11:75-76.
26. Renaudin, C. D., M. T. Troedsson, C. L. Gillis, V. L. King, and A. Bodena. 1997. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Placenta by Transrectal and Transabdominal Approach in the Normal Pregnant Mare. Theriogenology 47:559-573.
27. Ross, J., J. E. Palmer, and P. A. Wilkins. 2008. Body wall tears during late pregnancy in mares: 13 cases (1995-2006). J Am Vet Med Assoc 232:257-261.
28. Sertich, P. L., V. B. Reef, R. M. Oristaglioturner, P. L. Habecker, and A. D. Maxson. 1994. Hydrops Amnii in a Mare. J. Amer. Vet. Med. Assn. 204:1481-1482.
29. Threlfall, W. R. 1993. Retained placenta. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 614-621. Lea & Febiger, Phiadelphia, London.
30. Ueno, T., Y. Nambo, Y. Tajima, and T. Umemura. 2010. Pathology of lethal peripartum broad ligament haematoma in 31 Thoroughbred mares. Equine Vet J 42:529-533.
31. Vandeplassche, M. 1980. Obstetrician's view of the physiology of equine parturition and dystocia. Equine. Vet. J. 12:45-49.
32. Vandeplassche, M., J. Spincemaille, and R. Bouters. 1971. Aetiology, pathogenesis and treatment of retained placenta in the mare. Equine. Vet. J. 3:144-147.
33. Waelchli, R. O. and F. Ehrensperger. 1988. Two related cases of cerebellar abnormality in equine fetuses associated with hydrops of fetal membranes. Vet. Rec. 123:513-514.
34. Wichtel, J. J., E. L. Reinertson, and T. L. Clark. 1988. Nonsurgical treatment of uterine torsion in seven mares. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:337-338.

Problemas del periparto en la yegua

***AO McKinnon**, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT*

Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia

Una serie de lesiones y anormalidades ocurren al momento del parto y en el periodo post parto inmediato, las cuales pueden tener serias consecuencias para la yegua. La edad y raza pueden tener cierta influencia sobre la incidencia de estas complicaciones, pero muchas son accidentes asociados a la rapidez y violencia del proceso de parto. Frecuentemente el diagnostico es difícil debido a que los signos clínicos de muchos de los problemas post parto no son específicos. El reconocimiento temprano de las anormalidades peri parto puede mejorar el éxito del tratamiento. Algunas de estas condiciones representan un peligro para la vida, pueden comprometer seriamente el futuro reproductivo de la yegua y pueden causar un retraso considerable en el establecimiento de una preñez saludable si no son reconocidas y tratadas a tiempo. La ultrasonografía se ha transformado en una herramienta indispensable para el diagnostico, tratamiento y en algunos casos monitoreo de estas condiciones.

Algunos de los signos y causas de complicaciones en la gestación tardía en la yegua son:

- DESCARGA VULVAR
    - Venas varicosas vaginales
    - Maceración de fetos
    - Trauma vulvar
    - Separación prematura de la placenta
    - Desordenes del tracto urinario
- COLICO
    - Hidroamnios e hidroalantoides
    - Ruptura del tendón pre púbico y/o del tendón abdominal ventral
    - Hemorragia arterial
    - Torsión uterina
    - Aborto/parto prematuro
    - Hipermovilidad fetal
    - Ruptura uterina
    - Gestación prolongada
    - Cólico no originado del tracto reproductivo
- DESARROLLO PREMATURO DE LA GLANDULA MAMARIA Y LACTACION
    - Placentitis

- Separación prematura de la placenta
- Mellizos
- Aborto
- Causas desconocidas

- AGRANDAMIENTO DEL ABDOMEN VENTRAL
  - Ruptura del tendón pre púbico y/o del tendón abdominal ventral
  - Hidroamnios e hidroalantoides

PROBLEMAS DEL PERI PARTO

Maceración y momificación fetal

La momificación no es poco común cuando un mellizo muere y el otro continúa su desarrollo. La momificación de una preñez simple es rara, pero ha sido reportada (Barber and Troedsson, 1996; McCue et al., 1997; Meyers y Varner, 1991). En ocasiones, la lactación en una yegua preñada en último tercio puede sugerir compromiso fetal, aborto inminente o momificación, sin embargo comúnmente no se reconocen signos clínicos. Los fetos momificados se ven comúnmente en el parto o aborto. La maceración ocurre comúnmente cuando una preñez simple muere, no es abortada y la contaminación bacteriana inicia el proceso de autolisis fetal. Los signos externos de descarga vaginal pueden guiarnos al diagnostico.

El tratamiento en ambos casos consiste en la relajación sutil del cérvix y luego extracción. En ocasiones es necesario ayudar a la relajación cervical con PgE o Butilescopolamina.

En yeguas con preñeces dobles a término hemos observado, mediante ultrasonografía trans abdominal, casos de fetos momificados, pero estos pueden ser difíciles de detectar. En todos los casos las yeguas estaban en el último periodo de la gestación y habían comenzado la lactación. El diagnostico de momificación no fue fácil ya que todas tenían una preñez viable. En nuestra limitada experiencia parece que la identificación de la cabeza o costillas del feto como una entidad separada del feto vivo es la forma más sencilla y consistente de identificar partes fetales. A medida que avanza el proceso de momificación es más complicada la identificación de las partes fetales ya que todas asumen una ecogenicidad similar, sin embargo esto depende de la edad del feto al momento de la momificación. Solo un caso tenía una "membrana de mellizo", la cual probablemente estaba relacionada a la perdida más reciente de ese feto. La muerte fetal reciente se asocia con una ecogenicidad obvia de los huesos fetales (Fig. 1a y b).

Fig. 1a. Partes de un feto momificado/ macerado

Fig. 1a. Ecografia de un feto que ha muerto recientemente.

Hidropesias

La ultrasonografía es una herramienta útil para el diagnostico de acumulación excesiva de fluido en el útero de una yegua preñada.

El **Hidroalantoides** es una rara condición que ocurre durante el último trimestre de la preñez principalmente en yeguas multíparas luego de una gestación normal. Los signos clínicos incluyen un enorme incremento en el tamaño abdominal en 10 a 14 días, debido a una rápida acumulación de fluido alantoideo (Allen, 1986; Blanchard et al., 1987b; Waelchli and Ehrensperger, 1988). Los demás signos clínicos observados resultan de la presión ejercida por la excesiva cantidad de fluido. Las yeguas pueden presentar anorexia, taquicardia, taquipnea, disnea, edema ventral, cólico y dificultad para caminar y defecar. Las yeguas con casos avanzados pueden mostrar evidencia de hernia abdominal ventral o ruptura del tendón pre púbico.

La evaluación del tracto genital por tacto transrectal revela una enorme cantidad de fluido en el útero y puede resultar difícil palpar el feto. El pronóstico para obtener un feto vivo es malo y el manejo del caso debe dirigirse a salvar la vida de la yegua (Lofstedt, 1993). Debe inducirse el parto para liberar la presión en los órganos internos de la yegua. Debe romperse el alantocorion y comenzar con la remoción lenta del liquido alantoideo mediante sifonaje del fluido, mientras se le administran fluidos endovenosos y corticoides a la yegua para prevenir el shock. Nosotros creemos que no es la perdida de fluido la que causa el shock, sino que la perdida de fluidos remueve la presión sobre los vasos abdominales y lleva a un shock hipovolémico cuando esto ocurre con rapidez. Debe administrarse oxitocina para ayudar a la evacuación de los contenidos uterinos, sin embargo yeguas con inercia uterina pueden no responder al tratamiento.

El **hidroamnios** es una acumulación excesiva de fluido amniótico en la cavidad amniótica y tiene una baja incidencia en todas las especies (Christensen et al., 2006). El hidroamnios es reportado con menos frecuencia en la yegua que el Hidroalantoides (Sertich et al., 1994). El volumen normal del fluido amniótico en la yegua es de 3 a 7 litros. El hidroamnios tiende a desarrollarse gradualmente en varias semanas o meses durante la

última mitad de la gestación. La cavidad amniótica normal tiene una comunicación directa con el tracto digestivo del feto mediante la boca y el ano. El feto traga fluido y mantiene los niveles constantes, mientras que los monstruos fetales con anormalidades intestinales a menudo presentan exceso de fluido (8 a 10 veces lo normal) en la cavidad amniótica (hidroamnios) (Figs. 2a y 2b). El fluido amniótico está compuesto de saliva y secreciones de la nasofaringe del feto. Aunque la acción de tragar liquido por parte del feto puede jugar un rol importante en el mantenimiento del balance en el fluido fetal, otros mecanismos pueden ser importantes, ya que no se ha reportado incidencia de hidroamnios o hidroalantoides en fetos con atresia o agangliosis del tracto digestivo. En casos de hidroalantoides el pronóstico para la preñez es malo ya que la absorción y el parto prematuro son comunes. Afortunadamente el pronóstico de la fertilidad futura de la yegua es de regular a bueno ya que el tracto genital de la yegua usualmente es normal luego del fin de la preñez.

Fig. 2a. Se detecto un tamaño pequeño para la edad gestacional y un desarrollo anormal del tracto genital en este potrillo de una yegua con hidroamnios.

Fig. 2b. Este feto fue extraído manualmente luego de dilatar el cérvix en una yegua con hidroamnios.

El manejo del hidroamnios e hidroalantoides debe reconocer que en la mayoría de los casos habrá un resultado adverso para el feto sin importar cuando se realice la intervención así como un resultado adverso para la yegua si la intervención se retrasa significativamente. La urgencia del tratamiento es determinada por la severidad de los signos clínicos, los cuales pueden variar desde un abdomen agrandado en una yegua normal o con cólico, desgarro de la musculatura abdominal, aumento de la frecuencia cardiaca y signos de shock.

Las yeguas pueden presentar un cambio repentino en la forma y tamaño abdominal. Una distensión abdominal repentina resulta en anorexia, depresión, letargia progresiva con dificultad al caminar, edema ventral y disnea. En una preñez normal el alantoides contiene 8 a 15 litros de fluido y el amnios 3 a 5 litros; en caso de hidroalantoides el volumen del líquido puede ir desde 120 a 220 lt.

Tratamiento: es altamente improbable que la yegua sea capaz de mantener la preñez hasta dar a luz a un potrillo vivo, por lo tanto una vez diagnosticado es una decisión lógica terminar la preñez para asegurar la salud de la yegua y evitar mayores complicaciones. La inducción, sin embargo, es riesgosa. El objetivo es permitir la remoción lenta y gradual de los fluidos fetales para permitir que el sistema vascular de la yegua se adapte al cambio repentino en la presión abdominal, evitando de esa manera el shock con acumulación de sangre en la vasculatura abdominal una vez que el fluido es eliminado. En la preparación para la inducción debe vendarse la cola, vaciar el recto, limpiar el área perineal y colocar un catéter endovenoso de gran calibre para permitir la administración de grandes volúmenes de líquido si es necesario. La mejor forma de remover el fluido lentamente es realizar la dilatación manual del cérvix y pellizcar el corioalantoides. El cérvix es fácilmente dilatado con una manipulación manual suave en la mayoría de los estadios de gestación. Una vez que se rompe la membrana los fluidos comienzan a salir, si esto no ocurre puede colocarse una sonda estomacal y retirar el fluido lentamente por sifonaje. A menudo es mejor la remoción del fluido mediante una sonda, ya que de esta manera puede controlarse la tasa de eliminación. Hemos tenido colapsos en yeguas aun tomando más de 30 minutos para remover los fluidos, por lo que parece que la paciencia es importante. Una vez que se palpa el feto, este puede extraerse manualmente, si este es muy grande podemos estar frente a una distocia por lo que deben tomarse todos los recaudos para evitar un trauma cervical. En caso de hidroamnios el feto casi siempre será pequeño. Si se necesita inducir las contracciones uterinas puede administrarse oxitocina a baja dosis (5 UI) EV, sin embargo el útero agrandado y estirado a menudo no responde. El feto en ocasiones puede estar vivo por lo que los asistentes/dueño/estudiantes/etc. deben ser advertidos de esta posibilidad. El potrillo debe ser separado del cordón umbilical si va a ser eutanasiado. Debe monitorearse a la yegua para evaluar la retención de las membranas fetales lo cual ocurre comúnmente debido a la inercia uterina; oxitocina a baja dosis (5-10 UI) a cada hora puede ser de ayuda. El pronóstico para el futuro reproductivo de la yegua es bueno, con una buena fertilidad y sin tener mayores probabilidades de que vuelva a ocurrir el mismo problema.

RUPTURA DEL TENDÓN PRE PÚBICO Y DE LA PARED ABDOMINAL

Cierto grado de edema ventral es normal en la gestación tardía (especialmente en el hemisferio norte en donde por las noches se encierra las yeguas en un box restringiendo su movimiento), la profundidad del edema puede ser de hasta 10 cm. Este edema resulta de la restricción del drenaje linfático y del retorno venoso por el peso del útero grávido. Es importante diferenciar este edema fisiológico del edema inflamatorio secundario a desgarros de la musculatura ventral o del tendón pre púbico. Una ruptura en la pared abdominal de yeguas preñadas es común en yeguas viejas de razas pesadas (Jackson, 1982; Lofstedt, 1993), pero también ha sido reportado en otras razas. Las condiciones que causan una severa distensión de la pared abdominal como el hidroamnios e hidroalantoides, mellizos, edema ventral severo o trauma, pueden resultar en una ruptura del tendón pre púbico, ruptura de la pared abdominal o hernia, sin embargo muchos casos ocurren sin razón aparente y hasta hemos visto casos en yeguas preñadas por primera vez. Las yeguas presentan un severo edema ventral que corre cranealmente desde la ubre y en muchos casos abarcándola

también. El edema unilateral puede sugerir ruptura parcial del tendón pre púbico daño en la pared abdominal ventro-lateral. Las yeguas afectadas tienen dificultad para pararse y se niegan a moverse. Una progresión aguda de esta condición puede resultar en distress severo, cólico, taquipnea, taquicardia, sudoración, hemorragia interna, shock y muerte. El pronóstico para la yegua fue mejor en los casos en los que no hubo intervención y en que la ruptura no se encontraba asociada a hidroamnios o hidroalantoides (Ross et al., 2008). Aunque las causas de esta condición son similares, la apariencia clínica puede ayudar a diferenciarlas. Una yegua con ruptura del tendón pre púbico tendrá la cola y la tuberosidad isquiática elevada debido a la falta de soporte ventral de la pelvis, que resulta en lordosis y postura de burro. La glándula mamaria puede desplazarse cranealmente de su posición normal. Aunque una yegua con hernia abdominal o ruptura puede tener el abdomen agrandado, la parte craneal de su cola y tuberosidad isquiática estarán en posición normal.

El diagnostico de ruptura del tendón pre púbico o hernia de la pared ventral del abdomen puede ser difícil de confirmar. En yeguas en estado avanzado de gestación, la presencia del feto a menudo hace que la palpación transrectal del defecto sea muy difícil y la palpación transabdominal es imposible debido a la gran cantidad de edema en la zona. En nuestra experiencia la ultrasonografía puede ser de utilidad para identificar defectos en la pared abdominal y hernias intestinales, pero la extensión del daño puede ser difícil de esclarecer hasta luego del parto cuando la mayor parte del edema ha desaparecido. En ocasiones un diagnostico diferencial es la presencia de edema excesivo en la yegua pre parto. En casos de ruptura, las secreciones de la glándula mamaria estarán teñidas de sangre (Fig. 3), mientras que en el edema pre parto no habrá sangre. Esto tiene un importante significado diagnostico ya que el ejercicio es útil en la condición antes mencionada. Aquellas yeguas que sufrieron de rupturas en la pared abdominal deberían ser destinadas a programas de transferencia embrionaria, sin embargo algunas yeguas, en ocasiones han llevado gestaciones a término luego de un periodo de descanso.

El tratamiento dependerá de la extensión de la ruptura, del grado de dolor de la yegua, del estadio gestacional, de la viabilidad fetal y del valor comercial de la yegua y el potrillo. La interrupción de la gestación seria el tratamiento más humanitario para la yegua, sin embargo intentar soportar la yegua hasta el parto o hasta que el potrillo sea lo suficientemente maduro como para inducir el parto son enfoques realistas (Ross *et. al.* 2008). Debe restringirse el movimiento de las yeguas, aplicar soporte abdominal (Fig. 4) para sostener la musculatura abdominal, sin embargo deben tomarse medidas para prevenir las ulceras por presión. Se recomienda la utilización de AINES a efecto y de antibióticos de amplio espectro. También es de ayuda reducir el volumen de la ración y administrar un laxante suave. El feto debe ser examinado en repetidas ocasiones por ultrasonografía y deben monitorearse los electrolitos en leche cerca de la fecha probable de parto. Un deterioro marcado en la condición de la yegua o compromiso fetal puede llevar a realizar la inducción del parto o a cesárea. La asistencia del parto siempre es necesaria debido a la inhabilidad para contraer el abdomen.

Debido a la rapidez en el cambio de los parámetros clínicos, en muchos casos no se logra mucho con el tratamiento de sostén y debe inducirse el parto. En estas yeguas puede ocurrir un desgarro de la pared abdominal en cualquier momento y tener consecuencias severas para la vida de la yegua. La asistencia en el parto siempre es necesaria debido a la ausencia de presión abdominal. Si han transcurrido ya 315 días de gestación puede considerarse la inducción del parto. Si en opinión del veterinario la yegua puede sobrevivir por 4 o 5 días, puede iniciarse un tratamiento con 100 mg de dexametasona fosfato IM diariamente por 5 días (Ousey et al., 2006). La decisión de inducir el parto versus el aborto o inducción inmediata no debe ser tomada a la ligera, ya que una ruptura catastrófica o la muerte de

la yegua no son eventos poco comunes en estos casos en los que se retrasa el parto debido a la inducción con dexametasona. Se ha intentado la reparación de desgarros pequeños o parciales con mallas protésicas. Esto solo debe intentarse en yeguas post parto y puede no ser necesario, no se recomienda volver a preñar a esta yegua, especialmente si existe la posibilidad de incluirla en un programa de transferencia embrionaria.

Fig. 3. Ruptura de la pared abdominal, asociada a una hemorragia en el cuarto anterior de la glándula mamaria y calostro en el cuarto posterior.

Fig. 4 En algunos casos el soporte abdominal puede proporcionar alivio a la yegua.

Torsión uterina

La torsión uterina en la yegua ocurre en la gestación tardía (8 meses), más frecuentemente en razas pesadas que en razas livianas y no está asociada al parto a diferencia de la vaca. La baja incidencia de torsión uterina en yeguas es atribuida a la fijación sub-lumbar de los ovarios y a la inserción dorsal de los ligamentos anchos del útero. Las causas de torsión uterina en la yegua no están bien definidas, pero incluyen factores como movimientos fetales vigorosos, caídas repentinas, fetos de gran tamaño, volumen de fluidos fetales disminuido, falta de tono en el útero grávido, mesometrio largo y un abdomen profundo y grande. Los signos clínicos están relacionados a la severidad de la torsión e incluyen dolor abdominal, inquietud, sudoración, anorexia, micción frecuente, posición de burro, se mira al flanco y patea el abdomen. Los signos pueden estar presentes por un periodo variable de tiempo (desde pocas horas hasta 3 días o más) y pueden imitar a aquellos de las primeras etapas del parto.

El útero puede girar desde 90 a 540° a lo largo de su eje longitudinal, y visto desde posterior tiene la misma probabilidad de girar en el sentido de las agujas del reloj o en el sentido contrario (Fig. 5). En la yegua la torsión involucra típicamente al cuerpo del útero, no al cérvix o la vagina, como ocurre en la vaca. Puede no ser necesaria la corrección si la torsión es menor a 180° y el flujo sanguíneo hacia el útero no se encuentra comprometido. Una yegua con ruptura uterina puede mostrar signos de shock. El diagnostico puede realizarse en base a los signos clínicos y palpación transrectal del útero grávido; el examen vaginal es útil solo en ciertas ocasiones. La palpación transrectal revela la tensión en espiral de los ligamentos anchos en dirección a la torsión. Si la torsión es hacia la izquierda (visto desde posterior), el ligamento ancho del lado izquierdo estará tenso y se palpara por debajo del útero, mientras que el ligamento ancho del lado derecho se encontrara estirado dorsalmente sobre el útero distendido. Lo opuesto sucederá en una torsión hacia la derecha. El colon menos sufre variables grados de constricción debido a la compresión ejercida por los ligamentos anchos desplazados, y puede impedir la realización de un examen rectal completo. En tales casos es difícil evaluar la viabilidad fetal o la integridad uterina y puede ser imposible determinar en qué dirección esta rotado el útero. En nuestra experiencia la ultrasonografía no ha sido de utilidad en el diagnostico de torsiones uterinas; sin embargo ha sido útil para determinar si el feto está vivo y para evaluar desprendimientos de la placenta. En los casos en que el feto ya ha muerto el manejo es diferente y frecuentemente más agresivo.

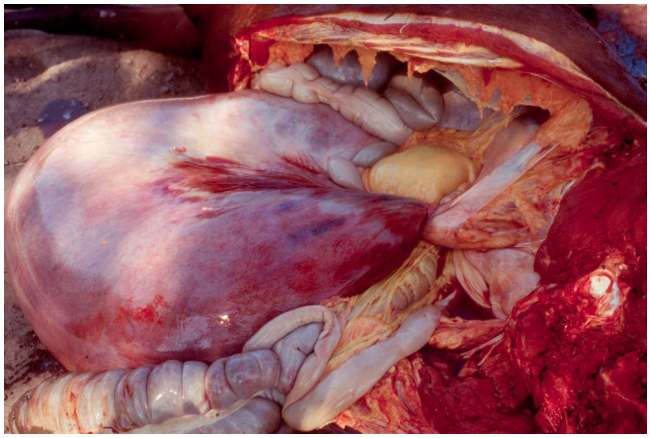


Fig. 5 Torsión uterina hacia la izquierda post mortem.

El pronóstico de la torsión uterina depende del grado de compromiso circulatorio resultante del enredo de los vasos sanguíneos y el ligamento ancho. Cuando el feto está vivo, las paredes uterinas no se encuentran severamente congestivas y/o edematosas, y el tratamiento se realiza con rapidez, el pronóstico para la sobrevida de la yegua y el nacimiento de un potrillo normal es bueno. Un estudio retrospectivo reciente mostró mayores tasas de de supervivencia para yeguas y potrillos cuando la torsión uterina ocurre con menos de 320 días de gestación en comparación con una presentación más tardía (Chaney et al., 2007). La supervivencia en general de las yeguas fue del 84% (53/63). La supervivencia de las yeguas cuando la torsión ocurría antes de los 320 días fue del 97% (36/37) en comparación con el 65% (17/26) de supervivencia en los casos en que la torsión ocurría luego de los 320 días. La supervivencia general de los potrillos fue del 54% (29/54). El 72% (21/29) de los potrillos sobrevivió luego de una torsión uterina previa a los 320 días de gestación, en comparación con el 32% (8/25) cuando la torsión ocurrió luego de los 320 días de gestación. Treinta yeguas fueron dadas de alta del hospital con una preñez viable luego de la corrección de una

torsión uterina, y 25/30 (83%) parieron un potrillo vivo que sobrevivió mas allá del periodo neonatal (Chaney et al., 2007).

Cuando la torsión uterina es diagnosticada al momento del parto la corrección puede ser realizada mediante manipulación trans-cervical del feto con el paciente de pie. El balanceo o torsión del feto en dirección contraria a la torsión corregirá más del 80% de las torsiones que se presentan en esta etapa. Sin embargo en la yegua no se presentan muchas torsiones al momento del parto. Para corregir la torsión puede hacerse rodar a la yegua en el suelo, pero se debe tener precaución en aquellas que están cercanas al parto debido al riego de ruptura uterina. Debe hacerse rodar a la yegua en la dirección de la torsión, para que esta "alcance" al útero. Puede ser necesaria la repetición del procedimiento varias veces hasta alcanzar la corrección. Deberá aclarársele al dueño los riesgos de ruptura uterina y aborto previo a la realización de la maniobra. La corrección quirúrgica puede realizarse de pie y por el flanco o por laparotomía por la línea media. En yeguas tranquilas, a 6 o más semanas de la fecha probable de parto, con una torsión poco complicada, la laparotomía de pie por el flanco es el tratamiento de elección. La presencia de un feto vivo facilita ampliamente la manipulación para la corrección de la torsión. En yeguas cercanas al parto puede requerirse el abordaje por ambos flancos. En yeguas a término y en las que se sospecha de lesiones gastrointestinales concurrentes, la laparotomía por la línea media ventral es el método de elección, y si se requiere de una cesárea puede realizarse al mismo tiempo.

Ruptura uterina (pre-parto)

La ruptura uterina ocurre frecuentemente en el peri parto como resultado de la intervención durante distocias, fetotomías o por movimientos violentos durante el parto. Sin embargo, en casos de torsión uterina (Wichtel et al., 1988), hidroamnios, hidroalantoides (Honnas et al., 1988) o casos idiopáticos ocasionales, la ruptura puede producirse previo al parto. Cuando el útero se rompe antes del parto la yegua puede no presentar signos de dolor, y si el feto escapa dentro del abdomen y produce una hemorragia, esta no es severa, la involución uterina puede producirse sin signos externos.

El diagnostico de la ruptura uterina puede facilitarse por palpación y ultrasonografía transrectal del útero, examen del feto, abdominocentesis y una historia de dolor abdominal moderado a severo durante el último trimestre de gestación. Una vez que el útero se ha roto y que el contenido ha salido hacia la cavidad abdominal, la pared uterina comienza a sentirse engrosada y corrugada debido a que el útero se contrae y comienza la involución rápidamente. El sitio de ruptura puede ser difícil de demostrar por ultrasonografía transrectal. Sin embargo la ultrasonografía transabdominal puede revelar a presencia del feto en el piso del abdomen con una excesiva cantidad de fluido libre en el abdomen.

Separación placentaria y separación relacionada a placentitis

La separación de una porción significativa del alantocorion del endometrio constituye una emergencia para el feto debido a una falla en el intercambio adecuado de oxigeno, dióxido de carbono y nutrientes. La separación prematura de la placenta puede presentarse en dos formas en yeguas preñadas: en forma aguda durante el parto y en forma crónica durante la gestación, asociada generalmente a placentitis. La placentitis crónica puede reconocerse por ultrasonografía transabdominal, sin embargo la ultrasonografía transabdominal es necesaria para examinar la región cervical en casos de placentitis ascendente (Fig. 6 a-d). La placentitis crónica ascendente o el edema pueden resultar en una separación y engrosamiento de la placenta sobre la región cervical.

La placentitis es la causa más común de pérdidas fetales en el último tercio de la gestación. Mientras que muchos casos responden al tratamiento, un tratamiento efectivo no siempre es posible. La principal razón de esta inefectividad en el tratamiento es la inhabilidad de diagnosticar la condición tempranamente. La principal causa de placentitis (◎ 90% de los casos) es una infección ascendente que ingresa al útero por el cérvix. Los patógenos más comunes aislados de infecciones placentarias son: *S. zooepidemicus* y *E. coli* (Macpherson, 2005; Macpherson y Bailey, 2008). Las yeguas con placentitis pueden no presentar signos clínicos hasta bien avanzada la condición. Típicamente las yeguas que sufren de placentitis son mayores de 12 años y tienen mala conformación perineal.

Fig. 6a Ultrasonografía abdominal de una yegua con placentitis (Fig. 10 a-d).

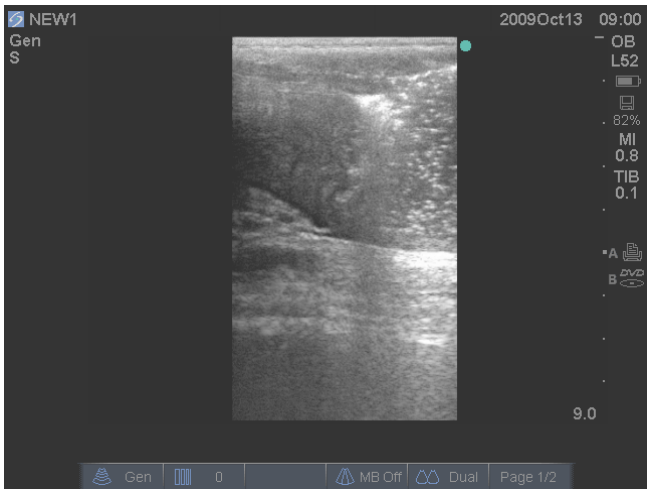


Fig. 6b Ultrasonografía transrectal que demuestra la presencia de aire en el cérvix y en el fluido. El fluido se encuentra fuera de la placenta.

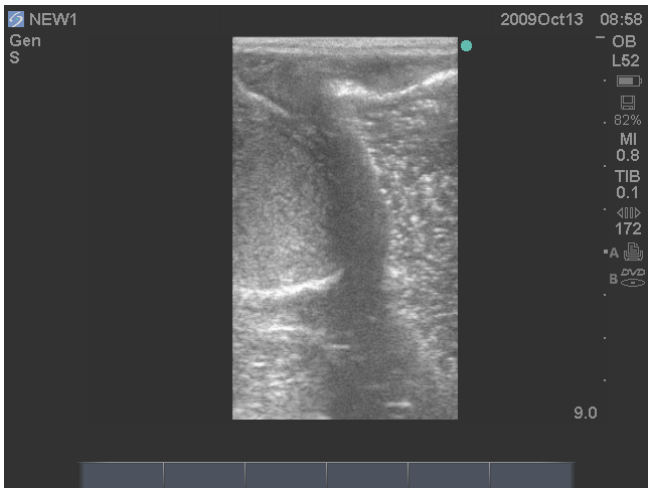


Fig. 6c Fluido fuera de la placenta con aire.

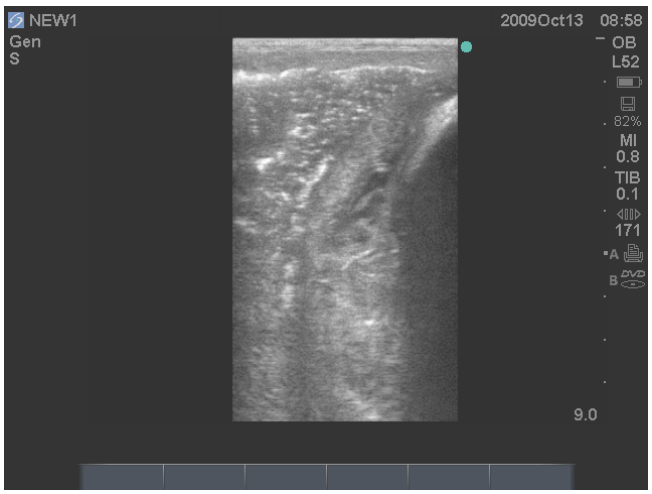


Fig. 6d Presencia de fluido fuera de la placenta, obsérvese el alantocorion y el feto de izquierda a derecha.

Signos clínicos

Los signos clínicos de placentitis son variables e incluyen descarga vulvar, desarrollo de la glándula mamaria, lactación y relajación cervical. Aquellas yeguas que presenten descargas vaginales en gestaciones avanzadas deben ser sometidas a un examen clínico completo, que incluya el examen de la glándula mamaria y la evaluación de la vagina y cérvix mediante un especulo. Sin embargo hay que tener en cuenta que la descarga vulvar a menudo no está presente. Esto puede deberse a que la descarga es muy poca o inexistente. Ya que la mayoría de las infecciones placentarias son ascendentes, el examen vaginal con especulo en yeguas con descarga purulenta revelara que el exudado se origina en el cérvix. Es muy importante identificar tempranamente cualquier descarga, y los signos pueden incluir descarga acumulada en la vulva, pelos de la cola y patas. Debe indicarse a los dueños que monitoreen a las yeguas a término en busca de estos signos.

El signo más común de placentitis es el desarrollo temprano de la glándula mamaria y lactación (véase debajo). El desarrollo temprano de la glándula mamaria puede indicar aborto inminente debido a una variedad de causas infecciosas y no infecciosas como torsión del cordón umbilical y preñeces dobles. La descarga vulvar es un signo clínico muy inconsistente; es probable que las yeguas afectadas presenten descargas, pero pueden ser producidas en cantidades muy pequeñas y no ser apreciadas.

Diagnóstico

La ultrasonografía transrectal y transabdominal son herramientas útiles para evaluar esta condición. Cuando se presenta una yegua con signos clínicos, debe realizarse una ultrasonografía transrectal y evaluar el espesor combinado útero placentario (ECUP). Una condición subclínica puede resultar en cambios ultrasonográficos leves que no son fácilmente distinguibles de lo normal. La ultrasonografía transrectal en yeguas en gestación tardía permite además la evaluación de la actividad fetal, características del fluido fetal, mediciones de la órbita fetal y evaluación subjetiva del amnios. El espesor combinado útero placentario (ECUP) es medido con un transductor lineal de 5 a 10 MHz sobre la región ventral del cuerpo del útero, ya que la región dorsal puede presentar edema en yeguas preñadas normales. El transductor debe posicionarse a craneal del cérvix y luego realizar movimientos hacia lateral hasta visualizar un vaso sanguíneo mayor a ventral del cuerpo uterino (Fig. 7). El área comprendida entre el vaso sanguíneo uterino y el fluido alantoideo representa el espesor combinado útero placentario; al menos deben tomarse tres mediciones y hacer un promedio.

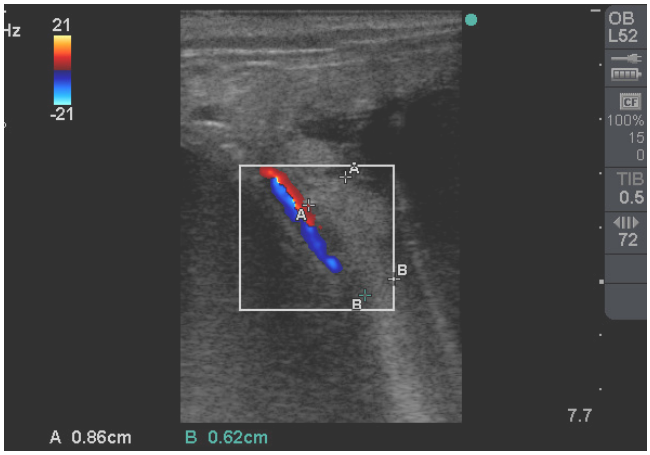


Fig. 7a Señal Doppler Color demostrando la posición de un vaso sanguíneo uterino ventral.

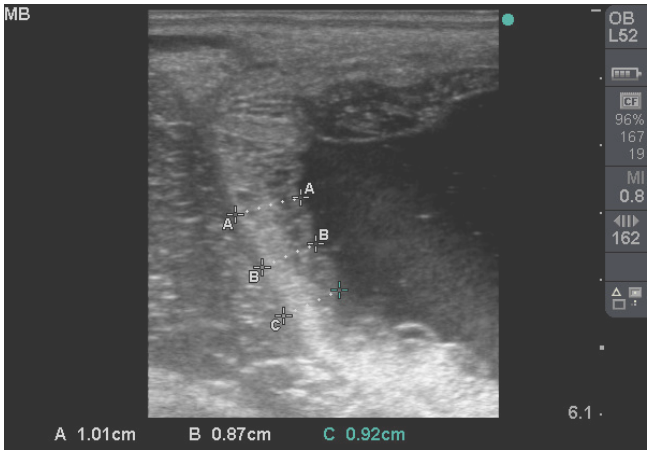


Fig 7b, mediciones de ECUP, el evaluador debe asegurarse de que el amnios no se encuentre en aposición con el corioalantoides, ya que esto resultara en un mayor ECUP (Figura cortesía de J. Pycock).

Valores normales de ECUP

Mes	Periodo gestacional	ECUP
9	241-270	<7mm
10	271-300	<8mm
11	301-330	<10mm
12	331-360	<12mm

(Renaudin et al., 1997; Renaudin et al., 1999)

La ultrasonografía transabdominal para evaluar el feto es una técnica que lleva tiempo y requiere de paciencia, buen equipamiento y conocimiento de los parámetros normales. El bienestar fetal puede evaluarse ultrasonográficamente mediante la frecuencia cardiaca fetal, actividad y tamaño del mismo. En fetos de todas las edades se observan periodos de inactividad, pero estos son más comunes en la gestación tardía, y duran aproximadamente 10 minutos. La detección de periodos prolongados de inactividad o de hiperactividad durante la palpación o ultrasonografía transrectal son de mal pronóstico para la vida fetal. Debido a la variación en la frecuencia cardiaca y actividad fetal en el tiempo, es necesario realizar repetidas evaluaciones.

Se ha demostrado que la placentitis causa un marcado incremento en el ECUP. Las mediciones por encima de los rangos normales han sido asociadas a aborto y patologías placentarias. Mientras que un valor elevado de ECUP sugiere que existe una patología, incrementos moderados requieren confirmación mediante la presencia de otros signos clínicos tales como separación placentaria. Las mediciones en estos casos son nulas, debido a la separación que es indicativa de una infección placentaria ascendente. No todas las yeguas que sufren de placentitis ascendente muestran engrosamiento del ECUP a la evaluación ultrasonográfica. El examen mediante especulo de las yeguas con descarga vaginal purulenta a menudo revela que el exudado se origina del cérvix; esto también permitirá realizar un hisopado del cérvix para determinar el o los agentes etiológicos y su patrón de sensibilidad. Además pueden medirse las concentraciones de estrógenos y progestinas para evaluar el estado de la unidad feto placentaria, y medirse los electrolitos de la secreción de la glándula mamaria para predecir la cercanía al parto.

Electrolitos de la leche

- Calcio, sodio y potasio
- Aumento rápido en la concentración de calcio pre parto ⊚10mmol/L
- La concentración de potasio es mayor que la de sodio en los últimos días de gestación.
    - Los cambios generalmente indican madurez fetal
- Las yeguas con placentas anormales muestran desarrollo precoz de la glándula mamaria y cambios en los electrolitos.
    - Aumento prematuro en la concentración de calcio ⊚10mmol/L
    - Los valores de sodio y potasio son esenciales para la interpretación de los resultados ya que los valores de calcio en muchos casos no son confiables.

Mediciones hormonales

- Progestinas y sulfato de estrona
- Muestras de sangre seriadas para determinar tendencias anormales

- Concentraciones de progestinas en disminución o consistentemente bajas en el último mes de gestación asociadas con aborto.
- Un aumento prematuro en las concentraciones de progestinas pueden ser indicativas de estrés fetal.
- Las concentraciones de sulfato de estrona demuestran viabilidad fetal.
- Una marcada disminución en la concentración de sulfato de estrona puede reflejar un feto comprometido.

Tratamiento

Al tener la sospecha clinica de placentitis, la finalidad del veterinario es contener la infección, reducir la inflamación y mantener la quietud miometrial.

Las drogas más utilizadas son:

- Antibióticos de amplio espectro
  - Luego de los resultados del cultivo y de las pruebas de sensibilidad. Muchos veterinarios utilizan una combinación de penicilina y gentamicina por vía EV por los primeros cinco días. Luego se cambia a sulfa-trimetoprim por via oral. Es difícil saber hasta cuando mantener a las yeguas en terapia y muchos veterinarios lo hacen hasta el parto.
- Drogas anti inflamatorias
  - Es más probable que el parto prematuro se deba a una inflamación de la placenta que a una infección fetal. Por lo tanto es importante tratar a estas yeguas con meglumina de flunixin, ketoprofeno o fenilbutazona.
- Progesterona
  - Se recomienda la suplementación con progesterona o el tratamiento con progestágenos sintéticos a altos niveles. Por ejemplo la utilización de altrenogest a una dosis de 0.088 mg/kg oralmente cada 24 hs.
- Drogas tocolíticas
  - El Clenbuterol puede ayudar a mantener la quietud del miometrio, ya que las yeguas con placentitis parecen tener un aumento de la motilidad uterina (McGlothlin et al., 2004).
- Pentoxifilina
  - Esta droga puede aumentar la perfusión a través de los capilares y tiene propiedades antiinflamatorias/anti-citoquinas. Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de yeguas con placentitis con una combinación de altrenogest, pentoxifilina y sulfa-trimetoprim ha prolongado exitosamente la gestación, con un mayor número de yeguas dando a luz a potrillos vivos en un modelo experimental de placentitis.

    "El objetivo fue determinar si el tratamiento por periodos prolongados de tiempo con sulfa-trimetoprim (antimicrobiano), pentoxifilina (antiinflamatorio/anticitoquina) y altrenogest (progestina sintética) mejoraría la tasa de preñez en yeguas con placentitis inducida experimentalmente. Diecisiete yeguas ponys normales, preñadas de entre 280 y 295 días fueron involucradas en este estudio. Se indujo la placentitis en todas las yeguas mediante inoculación intra cervical de Streptococcus equi sub especie zooepide-

micus (10(7) CFU). Cinco yeguas infectadas, no tratadas sirvieron de control (Grupo NO TRATADO). Doce yeguas (Grupo TRATADO) fueron infectadas y tratadas con sulfametoxazol (30 mg/Kg, VO c/12 hs), pentoxifilina (8.5 mg/Kg VO c/12 hs) y altrenogest (0.088 mg/kg VO c/24 hs) desde el inicio de los signos clínicos hasta el parto de un potrillo vivo o el aborto. Se cultivaron muestras de sangre de todos los potrillos al momento del parto y se obtuvieron muestras para cultivo de contenido estomacal y torácico de los fetos muertos. Más yeguas en el grupo TRATADO parieron potrillos vivos (10/12; 83%; P0.05) que en el grupo NO TRATADO (0/5; 0%). Diez de doce potrillos (83%) en el grupo TRATADO tuvieron cultivos sanguíneos negativos al nacimiento. Todos los potrillos en el grupo NO TRATADO (5/5; 100%) tuvieron cultivo positivo de una o más muestras (sangre, contenido estomacal, fluido torácico). Se detectaron bacterias en los cultivos endometriales de ambos grupos. Streptococcus equi subesp. zooepidemicus fue el microorganismo predominante recuperado de muestras de cultivo de fetos/potrillos o yeguas. Los autores infieren que la administración de sulfa-trimetoprim, pentoxifilina y altrenogest puede mejorar la viabilidad de los potrillos de yeguas con placentitis inducida experimentalmente (Bailey et al; 2010)"

La estrategia de tratamiento está enfocada a controlar la infección, reducir la inflamación asociada y promover la quiescencia miometrial. Se deben administrar antibióticos de amplio espectro antes de que estén disponibles los resultados del cultivo y sensibilidad. Se ha demostrado que la sulfa-trimetoprim (30 mg/Kg, cada 12 hs) o la combinación de penicilina procainica (15 mg/Kg, cada 12 hs) y gentamicina (6.6 mg/Kg, cada 24 hs) penetran la placenta y membranas fetales. Los casos de placentitis fúngica son un desafío adicional y su tratamiento va mas allá del alcance de este articulo.

Las progestinas están destinadas a promover la quiescencia uterina y tal vez a mejorar la perfusión de oxigeno de la placenta; se ha demostrado que el altrenogest previene el aborto inducido por prostaglandinas. Los tocolíticos como la isoxuprina o el clembuterol producen relajación uterina a corto plazo, sin embargo pueden no ser útiles en este escenario. Los antiinflamatorios no esteroidales (AINES) como la meglumina de flunixin y la fenilbutazona son opciones obvias para reducir la inflamación y prevenir el aborto inducido por prostaglandinas. Otros agentes como la pentoxifilina han sido investigados y se ha demostrado que disminuyen las citoquinas pro inflamatorias y reducen la tasa de mortalidad en bebes humanos prematuros con sepsis. Se ha demostrado que el acido acetilsalicilico (aspirina) reduce la incidencia de pre eclampsia en la mujer con placentación anormal y se ha demostrado que mejora el flujo sanguíneo uterino en la yegua. Las yeguas deben ser monitoreadas mediante ultrasonografía durante el tratamiento. El tratamiento en casos avanzados a menudo es infructuoso y comúnmente ocurren abortos, muerte fetal y partos prematuros de potrillos seriamente comprometidos. Frecuencias cardiacas fetales de 60 lpm al mes o dos meses de la fecha probable de parto es un indicador de mal pronóstico. Sin embargo, si estos casos son diagnosticados a tiempo el veterinario puede ser capaz de detener o enlentecer el proceso de enfermedad por el tiempo suficiente como para asegurar el parto de un potrillo viable. Es importante tratar cualquier potrillo nacido vivo, prematuro o no como un potrillo de alto riesgo. Luego del parto/aborto la yegua debe ser tratada de la misma manera que una yegua con metritis post parto. Una vez que una yegua ha sufrido de placentitis, debe considerarse de alto riego y debe ser tratada para prevenir recurrencias. Debe evaluarse la conformación perineal y realizar Caslick si existen dudas. El monitoreo ultrasonográfico del ECUP permitirá la detección temprana en preñeces futuras.

GESTACIÓN PROLONGADA

La gestación a menudo dura 310-374 días, pero preñeces normales pueden durar hasta 399 días (Vandeplassche, 1980). Hemos visto numerosos casos de gestaciones confirmadas que duraron más de 400 días con un caso nacido vivo a los 432 días. Los potrillos nacidos en estas gestaciones no son de mayor tamaño ni predisponen a la yegua a distocia (Vandeplassche, 1980). Los potrillos típicamente son pequeños, con frente prominente, cola larga y mucho manto. La duración de la gestación está controlada parcialmente por la nutrición y el genotipo del potrillo, pero las yeguas pueden controlar la duración de la gestación. Basado en los estudios que demuestran que la duración promedio de la gestación es mayor en yeguas servidas temprano en la temporada, Ginther sugirió que las yeguas pueden ser capaces de realizar ciertos ajustes para que sus potrillos nazcan con chances optimas de sobrevida (Ginther, 1992. El control fisiológico de este fenómeno parece estar relacionado al fotoperiodo (Hodge et al., 1982).

Los dueños y managers de los haras a menudo se preocupan por aquellas preñeces que se extienden más allá de la fecha probable de parto, y comienzan a presionar al veterinario para que induzca el parto. Si no se ha desarrollado la glándula mamaria y si se ha evaluado la viabilidad fetal por ultrasonografía, esta medida debe ser fuertemente evitada, aun si la duración de la gestación es mayor a un año. Hemos visto numerosos casos de potrillos que nacieron mediante inducción del parto luego de una gestación prolongada, en los cuales la inmadurez fetal resulto en una incapacidad de sobrevivir por un periodo mayor a 24-48 hs.

En la mayor parte de los casos la indicación en esperar pacientemente a que el parto se inicie sin intervención; sin embargo, la festucosis también causa gestaciones prolongadas y potrillos de gran tamaño, que pueden requerir intervención específica (Green et al., 1991). La festuca (*Lolium arundianceum*) infectada con el hongo endófito *Neotyphodium coenophialum*, (previamente llamado *Acremonium coenophialum*) si es ingerida por yeguas preñadas en los últimos estadios gestacionales puede tener serios efectos deletéreos sobre la preñez. La festucosis no solo causa gestaciones prolongadas, sino también distocia e hipogalactia. En potrillos afectados la festucosis causa dismadurez y pocas chances de sobrevida.

Las placentas de las yeguas afectadas son gruesas y edematosas, y se ha observado por ultrasonografía edema placentario y separación prematura del corioalantoides.

Esta enfermedad no tiene alta prevalencia en Australia.

PROBLEMAS POST PARTO

Un articulo interesante fue publicado en el Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, sobre razones de admisión y agudeza del diagnostico en yeguas mayores de 3 años que eran admitidas para tratamientos de emergencia a los 30 días post parto (Dolente et al., 2005). Las siguientes tablas resumen el diagnostico, el tiempo desde el parto hasta la admisión y la duración del problema (Dolente et al., 2005).

Rango de referencia	Todas	Hemorragia urogenital	Ruptura uterina	Metritis	Vólvulo del colon mayor	Afección del intestino delgado	Afección del ciego	Afección del colon menor
Parto hasta admisión (hs)	133	35	58	87	224	278	51	153
Duración de los signos (hs)	10	15	23	22	14	8.8	22	44

Las razones de la admisión y los comentarios se detallan en la siguiente tabla (Dolente et al., 2005).

Razón de la admisión	**% de diagnostico**	**Comentarios**
Hemorragia urogenital	16.6% (27/163)	11 hemorragias del ligamento ancho, 5 intraluminales y 6 hemoperitoneos
Vólvulos del colon mayor	16.6% (27/163)	
Metritis	8% (13/163)	70% tuvieron distocia
Afección del intestino delgado	7.4% (12/163)	10 vólvulos de intestino delgado
Ruptura uterina	5.5% (9/163)	Leucopenia (P<0.001)
Afección del ciego	6.1% (10/163)	6 Rupturas, impactación
Atrapamiento nefroesplénico	5.5% (9/163)	
Afección del colon menor	3.1% (5/163)	4 trauma
Colitis	3.1% (5/163)	
Desplazamiento del colon mayor	3.1% (5/163)	
Trauma rectovaginal	2.5% (4/163)	Mayormente prolapsos
Sin diagnostico	17.8% (29/163)	

Los lectores deben tener en cuenta que esta es una población de yeguas de un hospital de referencia, por lo tanto puede que no refleje lo que está sucediendo en los haras.

Hematomas y abscesos peri vaginales

La hemorragia intra pélvica peri vaginal que resulta en la formación de un hematoma no es difícil de diagnosticar por ultrasonografía. Grandes hematomas pueden ser drenados 2 a 3 días post parto, luego de la formación del coagulo. Si los hematomas no regresan o no se vuelven más firmes con el tiempo, debe sospecharse de la formación de un absceso.

En ocasiones pueden confirmarse por ultrasonografía y por aspiración con aguja, abscesos peri vaginales o abdominales en vez de retroperitoneales. El absceso debe ser cortado y drenado, si no es abdominal, sin embargo en ocasiones hemos drenado abscesos hacia el útero. Ocasionalmente, hematomas intra pélvicos de gran tamaño pueden dejar deformaciones de tejido cicatrizal permanentes que son palpables a ventral en el canal pélvico.

Hemorragia peri parto

La hemorragia de las arterias uterinas medias, útero-ováricas o con menor frecuencia de las iliacas externas es una causa importante de cólicos peri parto y muerte, a menudo en yeguas viejas y multíparas. La hemorragia de estos vasos es a menudo fatal, especialmente si la hemorragia se produce hacia la cavidad abdominal. La incidencia de las hemorragias post parto aumenta con la edad, sin embargo yeguas jóvenes también pueden verse afectadas (Arnold et al., 2008). Aunque puede ocurrir antes, durante o posterior al parto, es más común y clínicamente significativa durante o dentro de las primeras 24 hs post parto. La distocia no siempre está asociada a la hemorragia, y a menudo es vista en yeguas que tuvieron un parto normal. También se ha reportado hemorragia fetal luego de accidentes peri parto tales como torsión, ruptura o prolapso uterino.

Los signos clínicos asociados con la hemorragia peri parto dependen del sitio y severidad de la hemorragia y si el sangrado está contenido en los ligamentos anchos o si ha escapado hacia el abdomen. Las yeguas que sangran hacia los ligamentos anchos exhibirán signos variables de dolor abdominal como resultado de la tensión en los ligamentos y serosa uterina. Algunos de estos signos pueden ser sobreestimados debido a que las yeguas a menudo muestran cierto dolor abdominal asociado a las contracciones uterinas en el post parto inmediato. A medida que aumenta la pérdida de sangre y que progresa la distensión de los ligamentos anchos, los signos de dolor abdominal, sudoración, debilidad, taquicardia, taquipnea, ataxia y palidez de las mucosas se vuelven más aparentes. La ruptura de los ligamentos anchos o la perdida continua de sangre puede llevar a un rápido desencadenamiento de un shock hemorrágico. El curso de los signos clínicos puede ser extremadamente rápido en los casos en los que se produce ruptura completa y hemorragia directamente hacia la cavidad abdominal. La muerte ocurre a menudo a los minutos u horas luego de la aparición de los primeros signos de dolor. En otros casos las yeguas pueden exhibir signos leves en un principio (asociados con la acumulación de sangre en los ligamentos anchos) y luego colapsan. Las yeguas que sufren de hemorragia uterina en ocasiones son encontradas ya muertas. El tiempo de aparición de los signos clínicos parece estar relacionado al pronóstico ya que yeguas que no demuestran signos en las primeras 12 a 24 horas tienen un mejor pronóstico para su sobrevida. En relacion a lo anterior, en ocasiones las hemorragias contenidas en el ligamento ancho pueden pasar desapercibidas hasta el examen pre servicio. Las yeguas que muestran signos persistentes de dolor abdominal o pérdida de sangre inmediatamente luego del parto, deberían ser evaluadas por ultrasonografía y realizar una palpación muy cuidadosa del útero y ligamentos anchos. Tanto la ultrasonografía transrectal como la transabdominal son de utilidad en el diagnostico y manejo de casos de hemorragia peri parto en la yegua (Fig 8 a-c).

El tratamiento de yeguas con hemorragia peri parto depende de una variedad de factores tales como la frecuencia cardiaca y el tiempo en el que fueron identificados los signos post parto, el valor de la yegua y la disponibilidad para transportar a la misma.

Las yeguas identificadas luego de las 24 hs post parto con frecuencias cardiacas menores a 65 lpm pueden requerir solo descanso a box y condiciones de calma. El tratamiento de yeguas con hemorragia de la arteria uterina tiende a proveer analgesia y sedación, hemostasia, reponer el volumen cardiovascular y proveer profilaxis antimicrobiana. Aquellas yeguas que presenten signos significativos de shock hipovolemico pueden ser tratadas con fluidos EV, solución salina hipertónica, transfusiones sanguíneas, etc; teniendo en cuenta que la presión sanguínea no se eleve lo suficiente como para desprender los coágulos que puedan haberse formado.

Fig. 8a Ruptura de la arteria uterina media el día del parto (día 0)

Fig. 8b La misma yegua que la de la figura 11 a en el día 26, demostrando una reducción significativa en el tamaño.

Fig. 8c La misma yegua que en la figura 11a y b en el día 58.

Los agentes antifibrinoliticos como el acido aminocaproico o el tranexamico pueden ser administrados para ayudar a la estabilización del coagulo. Nosotros utilizamos una dosis de 50 gr de acido aminocaproico seguido de 25 gr cada 12 hs. La meglumina de flunixin, el butorfanol y la xilazina son útiles en el manejo del dolor. Se ha utilizado naloxona y formalina EV, pero no hay evidencia científica que sustente ninguno de estos tratamientos.

Los antibióticos de amplio espectro son necesarios para ayudar a prevenir la peritonitis y la formación de abscesos en el coagulo sanguíneo.

Un estudio reciente en un hospital de referencia en EEUU sugiere que el pronóstico de sobrevida es bastante bueno, dado que 61 de 73 yeguas (84%) sobrevivieron (Arnold et al., 2008), sin embargo, este estudio solo considero yeguas que fueron referidas y no incluyo a aquellas que murieron, las que se consideraron en riesgo para viajar y a aquellas que se considero no era necesario referir ya que tenían buenas chances de sobrevivir sin terapia.

Un artículo de investigadores Japoneses en referencia a la prevención o reconocimiento de yeguas en riesgo de hemorragia pre parto fue interesante. Histológicamente, la pared arterial adyacente a la ruptura mostro atrofia de las células del musculo liso con fibrosis de la túnica media y disrupción y/o calcificación de la lamina elástica interna (Ueno et al., 2010).

RAZONES PARA REALIZAR EL ESTUDIO: la hemorragia peri parto del ligamento ancho es una afección que pone en riesgo la vida de la yegua y hay pocos reportes sobre la etiología y la patogénesis del hematoma del ligamento ancho.

OBJETIVOS: obtener información sobre el sitio para el diagnostico temprano y patogénesis del hematoma del ligamento ancho en la yegua.

METODOS: se examinaron 31 yeguas que murieron de hematoma en el ligamento ancho peri parto para determinar los sitios de hemorragia. La distribución arterial de 5 yeguas jóvenes con varios partos sirvió de control negativo.

RESULTADOS: la edad y/o la mayor cantidad de partos fueron los factores predisponentes para esta afección. Las lesiones arteriales fueron encontradas mayormente en la arteria uterina (24 de 31 yeguas). Luego de esta, la arteria uterina proximal, que se encuentra a 15 cm de la bifurcación de la arteria iliaca fue el sitio más frecuente de ruptura (18 yeguas). Las lesiones ocurrían preferencialmente en las bifurcaciones, a lateral de las curvaturas u flexuras abruptas de las arterias. La morfología de las lesiones se clasifico en 3 tipos: rupturas con fisuras longitudinales, rupturas sin fisuras longitudinales y transecciones. Histológicamente, la pared arterial adyacente a la ruptura mostro atrofia de las células del musculo liso con fibrosis de la túnica media y disrupción y/o calcificación de la lámina elástica interna.

CONCLUSIONES: las lesiones arteriales que llevaron a hematoma del ligamento ancho en yeguas peri parto ocurrieron más frecuentemente en la arteria uterina proximal, y la atrofia de las células del musculo liso con fibrosis de la pared arterial fue uno de los factores predisponentes en yeguas viejas y multíparas. RELEVANCIA POTENCIAL: el monitoreo por ultrasonografía transrectal de pequeños aneurismas, desgarros de la pared, fibrosis medial en la arteria uterina proximal puede proveer información útil para el diagnostico temprano y posible prevención de hematomas en el ligamento ancho en yeguas peri parto.

Prolapso uterino

El prolapso uterino no es muy común en yeguas. El pronóstico depende de si la arteria uterina se rompe o no. Si no se rompe, el pronóstico es bueno. Si lo hace, la yegua eventualmente morirá de shock hipovolémico/cardiovascular. Por supuesto que otros factores pueden influir en el pronóstico, como prolapso y daño concurrente del intestino o vejiga, etc.

Hay una asociación entre el prolapso uterino y la distocia, y también condiciones que causen tenesmo (trauma vaginal y retención placentaria). Además de esto, el aborto, los mellizos y la edad avanzada también son factores que inciden.

La mayoría de los prolapsos ocurren inmediatamente post parto, sin embargo algunos han ocurrido algunas horas más tarde.

El manejo consiste en la reubicación a tiempo luego de la limpieza (Fig. 9).

Si la yegua esta estresada, debe administrarse anestesia general antes de la reubicación. Si el útero puede ser reposicionado de pie, hay que considerar realizar una epidural. Nosotros preferimos lo siguiente: xilazina (~0.17mg/kg bwt), lidocaína (~0.15 mg/kg bwt; ~3mL de solución de lidocaína al 2%) y ~6 mL de ringer lactato hasta llegar a un volumen de 10 ml. El volumen administrado en el primer espacio inter-coccígeo depende del tamaño de la yegua. Yeguas grandes (<600 Kg) pueden recibir una dosis completa de 10 ml y las yeguas más pequeñas (450-500 Kg) reciben entre 7 y 8 ml.

La epidural puede no ser necesaria para la reubicación, pero el tenesmo es muy común luego del procedimiento por lo que es recomendable hacerla. Considerar también realizar una operación de Caslick.

La técnica para la reubicación que nos ha funcionado bien es la utilización de una sabana limpia o de una bolsa de basura resistente (las baratas se rompen) para levantar el útero. Esto se realiza con dos ayudantes sosteniendo la sabana y el veterinario sosteniendo el peso del útero y reubicándolo. La falta de protección de la superficie del útero puede predisponer a la perforación de los tejidos.

Si es posible se recomienda remover la placenta al momento de la reposición del útero ya que de esta manera se reducen las contracciones de la yegua y se mejora la higiene. El control de la reubicación (que ambos cuernos no se encuentren invaginados) también disminuye la incomodidad y el tenesmo.

Si se sospecha de atonía uterina se pueden administrar bajas dosis de oxitocina (10UI) y calcio (50-250 ml de Borogluconato de calcio al 20%).

Es común que las yeguas que sufrieron de prolapso uterino no queden preñadas o tengan muerte embrionaria temprana en la misma temporada en que la ocurrió el prolapso.

Fig. 9 Prolapso uterino, limpio y listo para ser reposicionado.

Ruptura uterina

La ruptura uterina se asocia más comúnmente a la fetotomía o al parto asistido, sin embargo puede suceder en partos normales. Las complicaciones que se asocian a la ruptura uterina son hernia visceral, peritonitis, hemorragia, shock y muerte.

El sitio más común de ruptura es la superficie dorsal del cuerpo uterino, pero las laceraciones pueden ocurrir en cualquier lugar y son comunes en la punta de los cuernos.

El diagnostico inmediato es difícil a no ser que sean palpadas durante un examen interno de rutina post parto.

Se sospecha de este diagnostico cuando la yegua está deprimida e inapetente un día o mas post parto. En ocasiones las yeguas presentan cólico.

Un hemograma completo revelara leucopenia. La ultrasonografía y la abdominocentesis son los dos test diagnósticos más útiles. Otras técnicas tales como la laparoscopia en ocasiones también son beneficiosas dependiendo de la localización de la lesión.

El manejo medico es posible pero peligroso, en el caso de que la yegua sea de valor y de que la ruptura no sea dorsal y pequeña.

Las laceraciones dorsales en ocasione pueden ser suturadas a mano transvaginalmente.

En general es mejor realizar una laparotomía exploratoria, identificar la/s lesión/es y suturarla/s debidamente. Esta técnica también permite realizar lavajes concurrentes del abdomen. Si ha ocurrido una contaminación significativa, una técnica que suele utilizarse en nuestro hospital es resecar el omento y colocar un drenaje en la línea media ventral (un drenaje torácico funciona bien). El abdomen puede ser lavado utilizando una o dos bolsas de 5 lt de solución de Ringer con antibióticos, masajear el abdomen para mezclar el fluido con el contenido abdominal y luego retirarla por sifonaje.

El pronóstico para las yeguas con ruptura uterina está relacionado a la localización de la lesión y a la rapidez del diagnostico e instauración del tratamiento.

Retención de membranas fetales (RMF)/Síndrome de Metritis-Endotoxemia-Laminitis

Las membranas fetales usualmente son eliminadas a los 30 minutos hasta 3 hs luego del parto. Las yeguas en sistemas naturales pueden retener las membranas fetales en el útero por 24 o 48 hs sin complicaciones. Estas yeguas pueden preñarse y parir un potrillo al año siguiente sin tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento no siempre es necesario. En un ambiente de manejo intensivo las yeguas pueden presentar complicaciones (endometritis, metritis, laminitis y muerte) que están relacionadas a la retención de membranas por 8 hs o menos. El porcentaje de yeguas que retienen las membranas fetales se estima en un rango del 2 al 10% (Threlfall, 1993; Vandeplassche et al., 1971). La probabilidad de retención placentaria aumenta luego de una distocia, probablemente como resultado de un trauma en el útero o de agotamiento miometrial. El disturbio en las contracciones uterinas normales al parto también puede hacer que la retención placentaria sea más probable. La retención es particularmente probable si la yegua tenía placentitis. La retención placentaria es más común en el cuerno no gestante, tal vez por el aumento progresivo en el grado de pliegues placentarios y la adhesión del cuerno gestante al no gestante. La retención placentaria parcial es también más probable en el cuerno no grávido (Perkins y Frazer, 1994) debido a que la membrana corioalantoidea es más delgada, resultando en una mayor probabilidad de desgarro (Figura 10 a y b). La ultrasonografía puede utilizarse para visualizar pequeñas porciones de placenta retenida en una yegua post parto, ya que típicamente se encuentran rodeadas de fluido.

Una porción variable de la placenta puede verse expuesta a través de la vulva. Ocasionalmente el veterinario es alertado de la posibilidad de retención placentaria cuando no se encuentra la placenta luego del parto. Un examen aséptico intrauterino puede revelar la presencia de la placenta en la cavidad uterina. Alternativamente partes de la placenta

pueden permanecer en el útero e iniciar un cuadro de cólico luego de que la mayor parte de la placenta ha sido retirada. Comúnmente las membranas fetales pueden encontrarse días después cuando la yegua presenta signos de descarga. Las secuelas de retención placentaria varían desde ninguna hasta el desarrollo de metritis toxica, septicemia o endotoxemia, laminitis y muerte (Blanchard et al., 1987a) o prolapso uterino.

Se cree que la metritis toxica severa y la laminitis luego de la distocia resultan del daño al revestimiento uterino que promueve subsecuentemente la absorción de endotoxinas asociadas a la proliferación bacteriana normal en la yegua post parto. En pacientes con metritis toxica luego de distocia y retención placentaria, la pared uterina se vuelve delgada, friable e incluso necrótica. La absorción de bacterias y toxinas bacterianas probablemente sigue a la disrupción del endometrio y precipita los cambios vasculares periféricos que llevan a la laminitis (Blanchard et al., 1987a).

En ocasiones la membranas fetales pueden detectarse por ultrasonografía, días e incluso semanas luego del parto. La ultrasonografía además proveerá información sobre la involución uterina y la presencia de fluido en el lumen uterino (véase debajo).

Fig. 10a Se observa ultrasonograficamente una porción de placenta retenida en una yegua post parto.

Fig. 10b Retención de una porción del cuerno no gestante.

El manejo de yeguas con RMF puede hacer la diferencia en su futuro reproductivo, y si existe absorción de endotoxinas, potencialmente en su vida.

Tratamientos múltiples con 20 UI de oxitocina son recomendables para comenzar aproximadamente a las 3 hs post parto. La falla en la eliminación de las membranas a las 8 hs es una indicación para comenzar una terapia más agresiva. La visita veterinaria por RMF usualmente involucra lavajes y tracción. La falla en la remoción de las membranas retenidas por el veterinario no se considera un mal tratamiento (aun si el cliente no está de acuerdo), en lugar de esto, la oxitocina EV y el borogluconato de calcio (LeBlanc, 2008) pueden administrarse con buenos resultados. La yegua debe ser tratada con antibióticos sistémicos y anti inflamatorios no esteroidales.

Cólico

Hay una variedad de asociaciones entre el post parto y el cólico. La torsión del colon mayor puede estar asociada a yeguas post parto que tienen mayor espacio en el abdomen. Esta condición se ve ocasionalmente en algunos haras tarde en la temporada, cuando se ha acabado el pasto y las yeguas se alimentan de pellets. Alimentar a las yeguas con heno *ad libitum* elimino el problema.

La torsión del intestino delgado, ruptura del ciego, atrapamiento nefroesplénico y trauma del intestino delgado son condiciones relacionadas a las yeguas post parto.

Las yeguas con cólico post parto deben ser tratadas como cualquier otro caballo con cólico.

Si el dolor persiste y hay probabilidad de que el cólico sea de origen gastrointestinal (a diferencia de la hemorragia de la arteria uterina media) debe contemplarse la realización de una cirugía.

Prolapsos

Los prolapsos de vejiga con o sin ruptura no son problemas post parto comunes, sin embargo suelen suceder. Una vejiga prolapsada durante el parto es difícil de manejar sin anestesia y con el peso de los miembros mientras continúan las contracciones del parto re prolapsando la vejiga.

Los prolapsos de vejiga pueden ocurrir a través de rupturas vaginales o de la uretra.

En ocasiones es posible reparar una ruptura de vejiga prolapsando la misma a través de la uretra, pero abordajes por la línea media ventral o paramediana son a menudo más eficaces. El prolapso rectal durante o luego del parto a menudo tiene un mal pronóstico ya que puede ocurrir la ruptura de la arteria mesocólica en la región terminal del recto. Cuando el recto es reposicionado la yegua puede presentar signos de absorción de endotoxinas o puede no mostrar ningún signo clínico anormal por 24 a 48 hs. Si se sospecha de desvitalización del recto se recomienda re examinar a la yegua cada 12 a 24 hs. Cuando el recto se siente pegajoso y se pega en el guante sangre muy oscura cuando este se retira, entonces el recto está dañado irreversiblemente. Hemos visto ocurrir este cambio hasta 4 días post parto.

La cantidad aparente de recto que ha prolapsado no es indicativa de la potencial isquemia.

REFERENCIAS

1. Allen, W. E. 1986. Two cases of abnormal equine pregnancy associated with excess foetal fluid. Equine. Vet. J. 18:220-222.
2. Arnold, C. E., M. Payne, J. A. Thompson, N. M. Slovis, and F. T. Bain. 2008. Periparturient hemorrhage in mares: 73 cases (1998-2005). J Am Vet Med Assoc 232:1345-1351.
3. Bailey, C. S., M. L. Macpherson, M. A. Pozor, M. H. Troedsson, S. Benson, S. Giguere, L. C. Sanchez, M. M. Leblanc, and T. W. Vickroy. 2010. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. Theriogenology 74:402-412.
4. Barber, J. A. and M. H. Troedsson. 1996. Mummified fetus in a mare. J Am Vet Med Assoc 208:1438-1440.
5. Blanchard, T. L., R. G. Elmore, D. D. Varner, M. C. Garcia, J. A. Orsini, and R. S. Youngquist. 1987a. Dystocia, toxic metritis and laminitis in mares. Proc. AAEP 33:641-648.
6. Blanchard, T. L., D. D. Varner, A. M. Buonanno, J. E. Palmer, T. O. Hansen, and T. J. Divers. 1987b. Hydrallantois in two mares. J. Equine. Vet. Sci. 7:222-225.
7. Chaney, K. P., S. J. Holcombe, M. M. LeBlanc, J. G. Hauptman, R. M. Embertson, P. O. Mueller, and W. L. Beard. 2007. The effect of uterine torsion on mare and foal survival: a retrospective study, 1985--2005. Equine Vet J 39:33-36.
8. Christensen, B. W., M. H. Troedsson, T. A. Murchie, M. A. Pozor, M. L. Macpherson, A. H. Estrada, N. A. Carrillo, R. J. MacKay, G. D. Roberts, and J. Langlois. 2006. Management of hydrops amnion in a mare resulting in birth of a live foal. J Am Vet Med Assoc 228:1228-1233.
9. Dolente, B. A., E. K. Sullivan, R. Boston, and J. K. Johnston. 2005. Mares admitted to a referral-hospital for postpartum emergencies: 163 cases (1992-2002). J Vet Emerg Crit Care 15:193-200.
10. Ginther, O. J. 1992. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin.
11. Green, E. M., W. E. Loch, and N. T. Messer. 1991. Maternal and fetal effects of endophyte fungus-infected fescue. Proc. AAEP29-44.
12. Hodge, S. L., J. L. Kreider, G. D. Potter, P. G. Harms, and J. L. Fleeger. 1982. Influence of photoperiod on the pregnant and postpartum mare. Am J Vet Res 43:1752-1755.
13. Honnas, C. M., M. S. Spensley, S. Laverty, and P. C. Blanchard. 1988. Hydramnios causing uterine rupture in a mare. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:334-336.
14. Jackson, P. G. 1982. Rupture of the prepubic tendon in a shire mare. Vet Rec 111:38.
15. LeBlanc, M. M. 2008. Common peripartum problems in the mare. J Equine Vet Sci 28:709-715.
16. Lofstedt, R. M. 1993. Miscellaneous diseases of pregnancy and parturition. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 596-603. Lea & Febiger, Phiadelphia, London.
17. Macpherson, M. L. 2005. Treatment strategies for mares with placentitis. Theriogenology 64:528-534.
18. Macpherson, M. L. and C. S. Bailey. 2008. A clinical approach to managing the mare with placentitis. Theriogenology 70:435-440.
19. McCue, P. M., D. K. Vanderwall, and E. L. Squires. 1997. Fetal Mummification in a Mare. J Equine. Vet Sci 17:267-269.
20. McGlothlin, J. A., G. D. Lester, P. J. Hansen, M. Thomas, L. Pablo, D. L. Hawkins, and M. M. LeBlanc. Alteration in uterine contractility in mares with experimentally induced placentitis. Reproduction 127[1], 57-66. 2004.
21. Ref Type: Journal (Full)
22. Meyers, P. J. and D. D. Varner. 1991. Abortion of a mummified fetus associated with short uterine body in a mare. J Am Vet Med Assoc 198:1768-1770.
23. Ousey, J. C., M. Kolling, and W. R. Allen. 2006. The effects of maternal dexamethasone treatment on gestation length and foal maturation in Thoroughbred mares. Anim Reprod Sci 94:436-438.
24. Perkins, N. R. and G. S. Frazer. 1994. Reproductive emergencies in the mare. Vet Clin North Am Equine Pract 10:643-670.

25. Renaudin, C. D., M. T. Troedsson, and C. L. Gillis. 1999. Transrectal ultrasonographic evaluation of the normal equine placenta. Equine Vet Educ. 11:75-76.
26. Renaudin, C. D., M. T. Troedsson, C. L. Gillis, V. L. King, and A. Bodena. 1997. Ultrasonographic Evaluation of the Equine Placenta by Transrectal and Transabdominal Approach in the Normal Pregnant Mare. Theriogenology 47:559-573.
27. Ross, J., J. E. Palmer, and P. A. Wilkins. 2008. Body wall tears during late pregnancy in mares: 13 cases (1995-2006). J Am Vet Med Assoc 232:257-261.
28. Sertich, P. L., V. B. Reef, R. M. Oristaglioturner, P. L. Habecker, and A. D. Maxson. 1994. Hydrops Amnii in a Mare. J. Amer. Vet. Med. Assn. 204:1481-1482.
29. Threlfall, W. R. 1993. Retained placenta. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 614-621. Lea & Febiger, Phiadelphia, London.
30. Ueno, T., Y. Nambo, Y. Tajima, and T. Umemura. 2010. Pathology of lethal peripartum broad ligament haematoma in 31 Thoroughbred mares. Equine Vet J 42:529-533.
31. Vandeplassche, M. 1980. Obstetrician's view of the physiology of equine parturition and dystocia. Equine. Vet. J. 12:45-49.
32. Vandeplassche, M., J. Spincemaille, and R. Bouters. 1971. Aetiology, pathogenesis and treatment of retained placenta in the mare. Equine. Vet. J. 3:144-147.
33. Waelchli, R. O. and F. Ehrensperger. 1988. Two related cases of cerebellar abnormality in equine fetuses associated with hydrops of fetal membranes. Vet. Rec. 123:513-514.
34. Wichtel, J. J., E. L. Reinertson, and T. L. Clark. 1988. Nonsurgical treatment of uterine torsion in seven mares. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:337-338.

Some selected diseases of the breeding stallion

***AO McKinnon**, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT*

Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia

ABNORMALITIES OF THE EJACULATE

Haemospermia

Haemospermia is not uncommon in breeding stallions (Schumacher et al., 1995; Sojka and Carter, 1985; Varner et al., 2000; Voss and McKinnon, 1993). Mild cases (light pink ejaculates) do not affect fertility, however frank haemorrhage will. The source of the blood can be anywhere in the reproductive tract, but most commonly originates from lesions in the urethra, on the urethral process or on the penis itself. Causes of haemospermia include epididymitis, blocked ampullae, seminal vesiculitis, urethral strictures, urethritis, urethral varicosities, neoplasia, mucosal lesions of the urethra, or damage to the urethral process, glans penis or shaft of the penis (Bedford et al., 2000; Schumacher et al., 1995; Sojka and Carter, 1985; Varner et al., 2000; Voss and McKinnon, 1993).

The urethral process and glans penis are particularly susceptible to injuries from breeding mostly from lacerations from tail hairs. Profuse haemospermia is often associated with idiopathic defects of the mucosa in the proximal urethra that communicate with the underlying corpus spongiosum (Schumacher et al., 1995; Varner et al., 2000).Lesions caused by cutaneous habronema infection of the urethral process have been an important cause of haemospermia (McKinnon et al., 1988). They are thought to be less likely since the introduction of ivermectin . Bacterial urethritis has been reported as a relatively common cause of haemospermia in stallions (McKinnon et al., 1988; Voss and McKinnon, 1993).

Diagnosis is usually self evident but it may be more difficult to detect in stallions breeding naturally. Sometimes blood is seen coming from the mares vulva after breeding. To identify when and where the blood is coming from occasionally an open ended AV is necessary.

Haemospermia is best treated by identify and treating the primary condition. Systemic antibiotics that are concentrated into the urinary tract such as penicillin and TMS and urinary acidify agents appear to resolve many urethritis cases. An important part of therapy is sexual rest which be the firs line of treatment and continue for at least 14 days before re-evaluating the semen. Mucosal tears of the proximal urethra respond best to perineal urethrotomy (Schumacher et al., 1995). Occasionally strictures may result but this is more often associated with urethrotomy for urolithiasis (Laverty et al., 1992). In our hands this has been an excellent treatment.

See pictures on page 65

Urospermia

Urospermia may be harder to diagnose compared with haemospermia in stallions breeding by natural service. The problem should be immediately obvious with semen collection, however the condition is often intermittent making the diagnosis more difficult. Urospermia is more likely to occur with stallions that fail to ejaculate readily.

See pictures on page 65

In stallions suspected of urospermia, careful observation of the dismount sample will reveal the smell and sometimes colour of urine. Some stallion managers claim to feel gritty fluid pulses when the stallion ejaculates. Ultrasonography of the mare after service is a useful technique for diagnosis of urospermia in mares bred by natural service. Typically they have a hyperechoic accumulation of urine crystal sediment in the body of the uterus which although similar to the appearance of air lacks the typical air refraction.

See pictures on page 65

If, when examining a dismount specimen or a sample from the collection vessel, doubt exists as to the diagnosis, then detection of urea can be performed with lab sticks or with biochemistry in a laboratory. *'An experiment was conducted to evaluate three commercially available test kits, the Azostix, Multistix and uric-acid test, for the detection of urine in the equine ejaculate. Azostix, which tests for urea nitrogen, consistently detected urine in the equine ejaculate. Urine contamination was evident when a color change occurred in the reagent pad, going from yellow to green after 10 sec of exposure. The sensitivity of Azostix to urea nitrogen in contaminated samples was 39 mg/dl. The Multistix test kit also successfully detected urine in semen. In the Multistix nitrite pad the color changed from yellow to orange after 3.5 min of exposure to urine-contaminated semen. The Uric-acid test kit did not accurately detect urine-contaminated samples. It constantly elicited false positive results in all the control trials. The results of this study show that Azostix and Multistix are cost effective (1.25 per analysis) and accurate diagnostic aids for detecting urine in the stallion ejaculate'* (Althouse et al., 1989).

The causes of urospermia are largely unknown with most being idiopathic. Similar to this is retrograde ejaculation where the semen is ejaculated into the bladder (Brinsko, 2001). Fortunately this is uncommon but should be suspected when stallions appear to ejaculate and nothing is found in the collection bottle. Catheterisation of the bladder will reveal large numbers of sperm (Brinsko, 2001). *'Retrograde ejaculation was diagnosed in a 10-year-old Arabian stallion. Despite behavioral signs consistent with ejaculation, the collection receptacle of an artificial vagina remained devoid of semen on numerous occasions. Catheterization of the urinary bladder yielded large numbers of spermatozoa, even when an ejaculate was obtained, whereas low numbers (< 1 x 10(6)/ml) of spermatozoa are found in the bladder of clinically normal stallions after ejaculation. Endoscopic examination of the urethra, seminal colliculus, and bladder failed to reveal abnormalities. Medical treatment with imipramine hydrochloride apparently resulted in improvement initially, but was not curative. Further diagnostic and treatment measures were declined and the stallion was castrated. For stallions that seemingly fail to ejaculate or for ejaculates that contain lower seminal volumes or numbers of spermatozoa than expected, obtaining a urine sample after ejaculation via bladder catheterization is a simple diagnostic procedure that may be used to investigate the possibility of retrograde ejaculation'* (Brinsko, 2001)

Urine contamination of the semen is associated with a potentially reversible decrease of motility if an extender can be used to modify the effects of osmotic changes (Griggers et al., 2001). Concentrated semen has been shown to have a more pronounced effect on motility than dilute urine. '*Urospermia has been reported as a cause of infertility in numerous species. The detrimental effects of urine on spermatozoa are due, at least in part, to changes in pH and osmolarity. Semen was collected and subjected to conditions of varying pH (Experiment 1), of varying osmolarity (Experiment 2), and various quantities and concentrations of urine (Experiment 3) and effects on motility were recorded. Finally, semen was contaminated with urine and then either of 2 semen extenders was added, with or without centrifugation, in an attempt to alleviate the detrimental effect of urine on motility (Experiment 4). The results of these experiments showed that alterations in pH and osmolarity negatively affected stallion sperm motility. Optimal pH and osmolarity appeared to be approximately 7.7 and 315, respectively. Contamination of the ejaculate with urine significantly decreased sperm motility. Smaller quantities of dilute urine were less detrimental than larger quantities of dilute urine, and dilute urine was less detrimental than more concentrated urine. The addition of semen extender restored the motility of urine contaminated semen to that of the uncontaminated control, however centrifugation to remove urine provided no significant advantage'* (Griggers et al., 2001).

Management of urospermia is simple in some cases. Training the stallion to urinate properly before breeding has worked well in many instances in our hands. Imipramine and other drugs have shown promise without consistent or prolonged results (Sepulveda et al., 1999; Turner et al., 1995). In an AI program fractionation of the semen may work as normally the urine is produced at the end of ejaculation. The exception to this is the stallion that is having trouble breeding.

See pictures on page 67

Pyospermia

Pyospermia is defined as pus or WBC's in the ejaculate (plus or minus debris). It is not uncommon. When pyospermia is detected either grossly or through microscopic examination of the ejaculate it is most commonly associated with seminal vesiculitis or orchitis (even more rarely in association with epdidymitis). It is very uncommon for superficial infection of the reproductive tract to result in pyospermia.

Examination of the fractions of the ejaculate will help identify where the infection is originating from. If the pre seminal fluids are affected them infection of the urethra or more rarely the bulbourethral glands may be suspected.

WBC's in the seminal fraction suggests orchitis, epididymitis or ampullitis. The sperm rich fraction is comprised largely of fluid originating from the testes, epididymides and ampullae with minimal contributions from the seminal vesicles, prostate or bulbourethral glands. WBC's in the gel suggests seminal vesiculitis.

Examination of cytology from dismount samples is unlikely to be accurate as contamination from the mares vagina is confounding.

Examination of unstained samples can be inaccurate as round cells (spermatids) can be confused with WBC's.

Treatment of pyospermia depends on the location of the infection. In cases of bacterial orchitis, unilateral castration to resolve the condition appears to be common in our hands, despite aggressive antibiotic therapy. Clinicians should be aware that Glanders (Pseudomonas mallei) can cause orchitis (Mohammad et al., 1989). Treatment of epididymitis

can be affected with systemic antibiotics if identified early, however unilateral castration is often necessary (Brinsko et al., 1992; Held et al., 1990; Traub-Dargatz et al., 1991b). Seminal vesiculitis is discussed below. Urethritis is able to be treated with sexual rest, urinary acidifying agents and/or topical or systemic antibiotic therapy that is concentrated into the urinary tract (Sertich et al., 1998; Voss and Pickett, 1975).

ABNORMALITIES OF THE TESTES

Neoplasia

Neoplasia of stallions testicles is possibly an under represented condition as most males are castrated. However the seminoma is one tumour that occurs reasonably frequently. Other reported neoplastic conditions of the testicles are Sertoli cell tumours, leydig cell tumours and teratomas. Seminoma's frequently just appear. They are recognised when a manager or owner notices an increase in size of one of the testes. They are non painful and do not tend to metastasize frequently. The stallion responds well to unilateral castration. Teratomas are more frequently seen in abdominally retained testes.

See pictures on page 68

Trauma

Trauma is one of the most common insults to a stallion's testis. Usually this is associated with the act of breeding. It is usually not the immediate effect of trauma that hurts sperm production rather the effects of increased temperature and inflammation. We would expect no immediate changes to the spermiogram associated with trauma for ~ 7 days (reflecting the spermatozoa that have already been formed and are undergoing final maturation in the epididymis). Then we will see a decrease in spermatozoal numbers and progressive motility concurrent with an increase in morphological abnormalities (Friedman et al., 1990). How long this pattern persists for depends on the extent of the injury and long term factors associated with healing such as oedema, fibrosis, effect of autoimmune factors from damage to the blood testes barrier etc. Ultrasonography is an excellent tool to determine the degree of damage.

See pictures on page 69

The role of the veterinarian is to provide aggressive therapy that minimises thermal injury, insulation and inflammation as soon as possible. Hydrotherapy, anti-inflammatory and antibiotic treatments all have a part to play in minimising damage. Ice to decrease inflammation and thermal injury is important. NSAID's (Phenylbutazone (4.4 mg/kg,PO or IV)or flunixin meglumine (1.1mg/kg,IV)) are recognised as being critical to control inflammation.

Orchitis

Infectious orchitis is most often unilateral unless it is associated with peritonitis.

The affected testicle is hot, painful and swollen.

Ultrasonography is useful to diagnose and monitor treatment. On occasion systemic antibiotics will reverse the effects of orchitis but only rarely once an abscess has developed with the testes. Unilateral castration is the best option for these cases.

Degeneration

Testicular degeneration may be temporary or permanent.

Testicular degeneration is a secondary condition that usually is the result of a testicular insult. Thus preventing testicular degeneration when it is preventable is associated with early recognition of a testicular problem and appropriate aggressive treatment

Testicular degeneration is an acquired unilateral or bilateral atrophy of the seminiferous tubules, resulting in decreases in sperm production, spermatozoal quality, and testicular size and is distinguishable from testicular hypoplasia only by a known history of prior normal testicular size and function.

Diagnosis of testicular degeneration is made by semen evaluation. Serial sampling may be necessary to confirm decreased spermatogenic efficiency and to determine if the observed decrease in sperm output from a single determination is reversible or the result of permanent degeneration.

Testicular biopsy and histopathologic examination can definitively confirm testicular degeneration. The principle risks of testicular biopsy include hemorrhage, increased testicular pressure, adhesions between the parietal and visceral vaginal tunic, and disruption of the blood-testis barrier, resulting in an immune-mediated reaction. The preceding complications have the potential to induce testicular degeneration if it were not already present.

See pictures on page 70

Hydrocele

A hydrocele is an accumulation of fluid in the vaginal cavity (between the visceral and parietal vaginal tunic layers). It may be normal (common) due to direct communication with the peritoneum or associated with pathology such as trauma, decreased lymph drainage or even neoplasia. A small amount of fluid surrounding the visceral tunic to a depth of 5-10mm may be quite normal. In these circumstances the fluid readily outlines the tail of the epididymis. Fibrin or increased echogenicity is a cause for concern. On occasion a hydrocoele will form post castration as can look like the testicle was not removed at all.

Haematocele

A haematocele is an accumulation of blood in the vaginal cavity. This is mostly associated with trauma and therapy should be as for testicular trauma (see picture above under Trauma). Lavage of the vaginal tunic has been attempted to reduce adhesion formation (Blanchard et al., 1996). Ultrasonography can identify the turbid and swirling blood. If testicular rupture is confirmed by ultrasonography then unilateral castration is recommended.

ABNORMALITIES OF THE SPERMATIC CORD

Torsion

The long axis of the testis is horizontal (not vertical like the bull) and the tail of the epididymis lies caudad. A testis may rotate up to 180 degrees without any clinical signs and may be normal in some stallions. In general a 180 degree rotation is not permanent in a young stallion (< 3YO and is more likely to be permanent in an older stallion. Probably due to the effects of Strongulus edentatous migration and adhesions of the parietal and visceral tunic (Smith, 1973). Testicular torsions of > 180 degrees may cause vascular compromise. A torsion is recognised from a painful scrotum and may be associated with colic (Horney and Barker, 1975; Threlfall et al., 1990). Colour flow Doppler ultrasonography is a useful diagnostic aid. We use this modality in many conditions involving vascular lesions. '*A stallion was twice referred for evaluation of scrotal swelling and signs of pain. The first admission followed a 3-year period of recurrent signs of left-sided scrotal pain and swelling. After the removal of the left testis because of testicular torsion, the stallion was returned to service. The conception rate was 82% for the next breeding season. Two years after initial surgery, the stallion again was evaluated because of acute signs of right-sided scrotal pain and swelling. Right-sided testicular torsion was detected and corrected, and the testis was sutured in place. The stallion's conception rate for the following breeding season was greater than 90%*' (Threlfall et al., 1990).

The principle differential diagnosis is a scrotal hernia and this should be differentiated with ultrasonography and internal inguinal ring examination.

The testicle is most frequently removed but on occasion it may be spared and transfixed (Threlfall et al., 1990).

ABNORMALITIES OF THE PENIS AND PREPUCE

Infection

By far the most common and obvious infection of the penis and prepuce is coital exanthema caused by a type 3 herpes virus.

Coital exanthema is a self limiting venerally spread disease of stallions and mares breeding by natural service. On accession this may be spread from mare to mare by rectal examination even if gloves are changes (presumably from the probe). The incubation period is short (2-7 days) and on occasion causes problems to the stallion when pain and swelling temporarily interfere with desire to breed. Only very rarely is it associated with any major or long lasting sub-fertility.

ABNORMALITIES OF THE EPIDIDYMIS

Epididymitis

Epididymitis is generally bacterial and rarely occurs as a primary condition. It is commonly associated with orchitis, epididymitis. Recurrent signs of abdominal or inguinal pain, lethargy, and subfertility and an enlarged, painful epididymis is diagnostic. Ultrasonographic findings include hypoechoic and hyperechoic areas scattered throughout the epididymal tissue (Held et al., 1990; Traub-Dargatz et al., 1991a). Large numbers of inflammatory cells are present in the ejaculate, and bacterial cultures reveal *Streptococcus zooepidemicus* most commonly. Treatment may be attempted in acute cases with antibiotic therapy. The prognosis for future fertility in cases of epididymitis is poor, and even in unilaterally

affected stallions that underwent hemicastration, a positive culture was still obtained several months following removal of the affected epididymis (Held et al., 1990).

ABNORMALITIES OF THE ACCESSORY SEX GLANDS

Seminal vesiculitis

Seminal vesiculitis is a frustrating condition to treat on occasions.

The case report presented below of cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis highlights our understanding and management of the condition (Fennell et al., 2010).

See pictures on page 71

Semen collection and cryopreservation offer considerable advantages over natural mating in prevention of transmission of pathogenic organisms between mares and stallions (Couto and Hughes 1993). Whilst seminal vesiculitis is an uncommon condition in the stallion, the seminal vesicles are more susceptible to infection than other accessory genital glands (Varner et al. 2000). The seminal vesicles are elongated hollow pouches about 15 to 20 cm long and 5 cm in diameter, located immediately lateral and distal to the ampullae, opening into the urethra at the colliculus seminalis (Amann 1993a). They are responsible for the production and storage of gel, which is the last fraction contributed to a complete ejaculate (Amann 1993b). Treatment of seminal vesiculitis is particularly challenging due to the persistent nature of infection and reduced fertility associated with the disease (Varner et al. 2000).

A six year old 610kg warmblood stallion, which had previously covered a small number of mares by hand mating was admitted for semen collection and cryopreservation. Initial physical examination did not reveal any abnormalities. Testicles were palpated as normal and total scrotal width measured 122 mm. On Day 12 following admission, the stallion produced an ejaculate contaminated with purulent debris and blood. Semen was collected again six hours later and this ejaculate was similarly contaminated. Purulent material from the first contaminated ejaculate was examined microscopically, and found to have a predominance of neutrophils (92%). There were 8% mononuclear cells. A heavy pure growth of Streptococcus species group C was cultured, and found to be sensitive to penicillin, ceftiofur and trimethoprim/sulphonamide (TMPS). Physical examination did not reveal any abnormalities. Haematological and serum biochemical analyses were unremarkable. Trans-rectal palpation and ultrasonographic examination of the seminal vesicles was unremarkable as both vesicles were of similar size and consistency and all structures of similar echogenicity.

A semen-freezing extender (containing several ingredients, including egg yolk and glycerol) was then added to the centrifuged sperm pellet to a final concentration of ~250 $x10^6$ sperm per ml. Ticarcllin (1mg/ml) and amikacin (0.5mg/ml) were also added to the extended sample prior to freezing. Ejaculates were frozen in 0.5-ml straws in a programmable cell freezer. Twenty four hours after collection, 2 straws from each ejaculate were thawed in a water bath at 38ºC. A sample from each straw was submitted for microbial culture and exhibited no growth. Post-thaw motility results of total motile spermatozoa were between 50-70%, and post-thaw progressively motile spermatozoa were between 30-50%. A total of 652 straws were frozen, which was sufficient for ~ 80 doses, assuming 1 billion spermatozoa (8 straws) would be utilized per insemination dose.During the semen-freezing period, one contaminated ejaculate was collected. This sample appeared sanguineous rather than

purulent. The sample was submitted for microbial culture and a moderate mixed growth of gram positive and gram negative organisms was isolated. The stallion has subsequently been used for natural mating of 35 mares with good fertility (pregnancy).

See pictures on page 74

This case indicates that whilst it may be difficult to achieve a cure in stallions infected with seminal vesiculitis, it is possible to manage a stallion successfully to allow cryopreservation of his semen. Fertility with natural mating may also be achieved. The frozen ejaculates displayed acceptable post-thaw motility characteristics. It is expected that semen displaying a progressive motility of greater than 30% will result in an acceptable pregnancy rate of 35% per cycle or greater (Samper 2001; Vidament 2005).

Stallions suffering from seminal vesiculitis can present with a wide range of clinical signs. Some stallions may demonstrate reluctance to breed or ejaculate or pain on ejaculation (Varner et al. 1991b). Typically however, affected stallions do not display overt clinical signs, and do not display pain when breeding, urinating or defecating (Varner et al. 2000). Despite requiring multiple mounts prior to ejaculation into an AV, the observation that the stallion in our report displayed normal behaviour during

Diagnosis of seminal vesiculitis involves gross and microscopic examination of the contaminated ejaculate. Features of the disease include observation of purulent, blood tinged debris in the ejaculate and a predominance of neutrophils on microscopic examination (Varner et al. 2000). Definitive diagnosis involves localisation of infection to a specific site in the urogenital tract. In this case, ultrasonographic examination was unrewarding, however, this technique has been reported as a useful tool in the diagnosis of seminal vesiculitis in stallions (Little and Woods 1987; Malmgren and Sussemilch 1992; Pozor 2005) and bulls (Mickelsen et al. 1994). Other reports have also found no palpable difference between the affected and unaffected vesicle. (Varner et al. 2000). In this stallion, endoscopic visualisation of discoloured secretion in the lumen of the left vesicular gland, with cytologic analysis of the semen confirming a predominance of neutrophils, allowed confirmation of the diagnosis. Further diagnostic evaluation may have included catheterisation of the vesicular gland for sampling and cytological analysis and culture and sensitivity testing (Varner et al. 1991b). However, prior pure culture of Streptococcus species Type C from the first affected ejaculate, allowed this step to be omitted.

Treatment of infection of the accessory genital glands is frequently unrewarding and this finding has been widely reported across species (Blanchard et al. 1988; Cavalieri and Van Camp 1997; Wagenlehner et al. 2005). As yet, there have been few reports of effective treatment. Surgical treatment involving vesiculectomy has been reported to be effective in the stallion (Varner et al. 1993) and the bull (Hooper et al. 1994). Unfortunately, complications including haemorrhage, haematoma formation and abscessation frequently occur in association with vesiculectomy techniques (Cavalieri and Van Camp 1997) . Despite this, vesiculectomy remains a viable treatment option in stallions that do not respond to medical treatment and seminal characteristics following vesiculectomy appear to be good (Klug et al. 1979).

Medical treatment is centred on effective antimicrobial therapy. The inability of many antimicrobials to penetrate the vesicular gland and achieve effective antimicrobial concentrations at the site of infection remain one of the main reasons for treatment failure (Blanchard et al. 1988; Varner et al. 1991b). Favourable characteristics of antimicrobials for penetration of the accessory genital glands include high lipid solubility, low molecular size, low binding affinity with plasma proteins and a high pKa (Wagenlehner et al. 2005). Gentamicin

has been shown to be ineffective in penetrating the vesicular glands (Blanchard et al. 1988; Strezmienski et al.) Systemic treatment with procaine penicillin has been effective in alleviating the condition in some stallions (Pozor, M. 2006, pers. comm.). Furthermore, it is likely that TMPS has favourable characteristics that may allow effective concentrations to be achieved in the vesicular glands (Varner et al. 1993). Local infiltration of antimicrobials is a useful adjunct to systemic therapy and may overcome problems associated with poor penetration (Varner et al. 1993). Common organisms associated with seminal vesiculitis include Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus spp. Staphylococcus spp. and Brucella abortus (Varner et al. 1991b).

In this reported case, the infective organism, Streptococcus Group C, was susceptible to penicillin and TMPS, among others. These two drugs were selected for administration. In the human literature, fluoroquinolones are the drug of choice for treatment of chronic bacterial prostatitis (Wagenlehner et al. 2005). This is due to characteristics which favour penetration of the accessory sex glands, and also the predominance of resistance to other antimicrobials in organisms typically associated with the disease in humans.

The potential detrimental effects of antimicrobial therapy on sperm function are recognised (Hargreaves et al. 1998). However, one study suggested that treatment with TMPS had no effect on motility characteristics (Bedford and McDonnell 1999). Therefore, long term therapy with TMPS may be a sound treatment option for stallions infected with seminal vesiculitis and can be continued whilst the stallion is breeding.

Addition of antimicrobials to extenders for both chilled and frozen semen should be an industry standard intended to extend the longevity of semen and prevent disease transmission (Loomis 2006) !. It is likely that semen needs to be exposed to antimicrobials in the extender for at least 20 minutes to facilitate effective bacterial killing (Blanchard et al. 1987). Blanchard et al. (1987) reported that breeding of mares with semen from stallions infected with seminal vesiculitis is likely to confer this infection to the uterus. Furthermore, their study revealed that addition of polymixin-B to extender significantly improved the pregnancy rate of mares bred with the semen.

In this stallion, freezing of ejaculates was not attempted until appearance, cytological analysis and semen culture were normal. Similar findings have been documented in bulls, in which antimicrobial therapy has allowed for resolution of signs such that cryopreservation of semen may be performed (Cavalieri and Van Camp 1997). More recently, the success of freezing sperm-rich fractionated samples has been reported (Katila et al. 2002). It has been shown that spermatozoa from stallions infected with seminal vesiculitis are rarely affected unless the sperm is exposed to the infected seminal fluid (Varner et al. 1991b). Thus, successful cryopreservation of semen from stallions infected with seminal vesiculitis may be facilitated through sampling of sperm-rich fractions, in addition to the use of antimicrobial therapy.

This case report highlights the tools available for management of stallions with seminal vesiculitis. It has been demonstrated that many diseases of stallions may be overcome with the use of artificial breeding techniques (Varner et al. 1991a). In our reported case, a stallion infected with seminal vesiculitis was successfully managed with local infiltration and systemic treatment with antimicrobials. The ejaculates were frozen with the addition of antimicrobials, as is routine practice. Transmission of diseases may be prevented through the judicious use of antimicrobials in extender combined with sound minimum contamination breeding techniques. In addition, collection and analysis of ejaculates prior to breeding allows for close monitoring of semen quality.

REFERENCES

1. Althouse, G. C., S. W. J. Seager, D. D. Varner, and G. W. Webb. 1989. Diagnostic aids for the detection of urine in the equine ejaculate. Theriogenology 31:1141-1148.
2. Bedford, S. J., S. M. McDonnell, E. Tulleners, D. King, and P. Habecker. Squamous cell carcinoma of the urethral process in a horse with hemospermia and self-mutilation behavior. J Amer Vet Med Assn 216[4], 551. 2000.
3. Ref Type: Journal (Full)
4. Blanchard, T. L., D. D. Varner, and S. P. Brinsko. 1996. Theriogenology question of the month. Scrotal hematocele. J Am Vet Med Assoc 209:2013-2014.
5. Brinsko, S. P. Retrograde ejaculation in a stallion. J Amer Vet Med Assn 218[4], 551. 2001.
6. Ref Type: Journal (Full)
7. Brinsko, S. P., D. D. Varner, T. L. Blanchard, R. L. Relford, and L. Johnson. 1992. Bilateral infectious epididymitis in a stallion. Equine Vet J 24:325-328.
8. Fennell, L. C., A. O. McKinnon, and C. J. Savage. 2010. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. Equine Vet Educ 22:215-219.
9. Friedman, R., M. Scott, S. E. Heath, J. P. Hughes, P. F. Daels, and T. Tran. 1990. Seminal characteristics of stallions with transitory testicular impairment. Proc. AAEP3-13.
10. Griggers, S., D. L. Paccamonti, R. A. Thompson, and B. E. Eilts. 2001. The effects of ph, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. Theriogenology 56:613-622.
11. Held, J. P., S. Adair, M. D. McGavin, W. H. Adams, R. Toal, and J. Henton. 1990. Bacterial epididymitis in two stallions. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197:602-604.
12. Horney, F. D. and C. A. V. Barker. 1975. Torsion of the testicle in a standardbred. Can. Vet. J. 16:272-273.
13. Laverty, S., J. R. Pascoe, G. V. Ling, J. P. Lavoie, and A. L. Ruby. 1992. Urolithiasis in 68 horses. Vet. Surg. 21:56-62.
14. McKinnon, A. O., J. L. Voss, G. W. Trotter, B. W. Pickett, R. K. Shideler, and E. L. Squires. 1988. Hemospermia of the stallion. Equine. Pract. 10:17-23.
15. Mohammad, T. J., M. I. Sawa, and Y. A. Singh. 1989. Orchitis in Arab stallion due to Pseudomonas mallei. Indian Journal Of Veterinary Medicine 9:15-17.
16. Schumacher, J., D. D. Varner, D. G. Schmitz, and T. L. Blanchard. 1995. Urethral defects in geldings with hematuria and stallions with hemospermia. Vet Surg 24:250-254.
17. Sepulveda, M. H., G. Q. Rocha, G. W. Brumbaugh, J. Montiel, S. Rodriguez, and E. C. deMorales. 1999. Lack of beneficial effects of bethanechol, imipramine or furosemide on seminal plasma of three stallions with urospermia. Reprod Domest. Anim 34:489-493.
18. Sertich, P. L., M. A. Pozor, S. A. Meyers, and J. S. Brown. 1998. Medical-Management of Urinary Calculi in a Stallion with Breeding Dysfunction. J Amer. Vet Med Assn. 213:843.
19. Smith, J. A. 1973. The occurrence of larvae of Strongylus edentatus in the testicles of stallions. Vet. Rec. 93:604-606.
20. Sojka, J. E. and G. K. Carter. 1985. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. Compendium. on. Cont. Ed. 7:587-590.
21. Threlfall, W. R., C. L. Carleton, J. Robertson, T. Rosol, and A. Gabel. 1990. Recurrent torsion of the spermatic cord and scrotal testis in a stallion. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196:1641-1643.
22. Traub-Dargatz, J. L., G. W. Trotter, B. Kaser-Hotz, D. G. Bennett, M. L. Kiper, D. N. Veeramachaneni, and E. Squires. 1991a. Ultrasonographic detection of chronic epididymitis in a stallion. J Am Vet Med Assoc 198:1417-1420.
23. Traub-Dargatz, J. L., G. W. Trotter, B. Kaser-Hotz, D. G. Bennett, M. L. Kiper, VeeramachaneniDN, and E. Squires. 1991b. Ultrasonographic detection of chronic epididymitis in a stallion. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198:1417-1420.
24. Turner, R. M. O., C. C. Love, S. M. McDonnell, R. W. Sweeney, E. D. Twitchell, P. L. Habecker, L. K. Reilly, M. A. Pozor, and R. M. Kenney. 1995. Use of Imipramine Hydrochloride for Treatment of Urospermia in a Stallion with a Dysfunctional Bladder. J. Amer. Vet. Med. Assn. 207:1602.

25. Varner, D. D., T. L. Blanchard, S. P. Brinsko, C. C. Love, T. S. Taylor, and L. Johnson. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. Anim Reprod Sci 60-61:493-509.

26. Voss, J. L. and A. O. McKinnon. 1993. Hemospermia and urospermia. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 864-870. Lea & Febiger, Philadelphia, London.

27. Voss, J. L. and B. W. Pickett. 1975. Diagnosis and treatment of haemospermia in the stallion. J. Reprod. Fertil. Suppl151-154.

Enfermedades y alteraciones de padrillos en servicio

***AO McKinnon**, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT*

Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia

ANORMALIDADES DEL EYACULADO

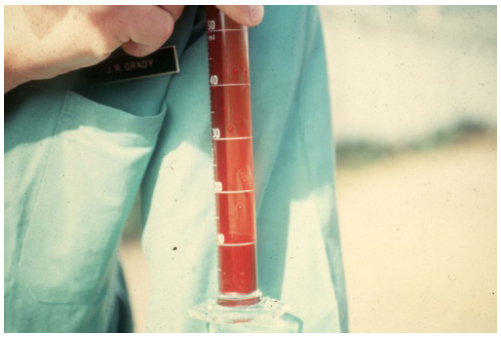
Hemospermia

La hemospermia no es rara en padrillos en servicio (Schumacher et al., 1995; Sojka and Carter, 1985; Varner et al., 2000; Voss and McKinnon, 1993). Los casos leves (color rosado pálido del eyaculado) no afectan la fertilidad, pero si una hemorragia evidente. El origen de la sangre puede ser cualquier punto del tracto reproductivo, pero lo más frecuente es que se origine de lesiones de la uretra o del proceso uretral del pene. Las causas de hemospermia incluyen epididimitis, bloqueo de la ámpula, vesiculitis, contracturas de la uretra, uretritis, varicoceles de la uretra, neoplasias, lesiones de la mucosa uretral, daño del proceso uretral o del glande (Bedford et al., 2000; Schumacher et al., 1995; Sojka and Carter, 1985; Varner et al., 2000; Voss and McKinnon, 1993).

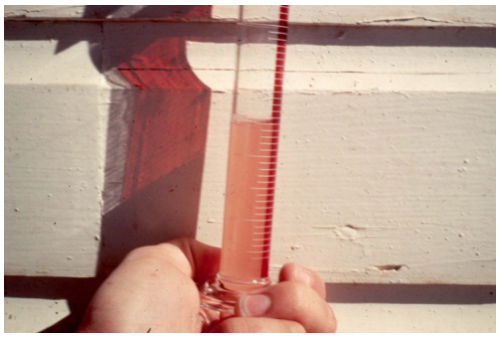
El proceso uretral y el glande son particularmente susceptibles a lesiones producidas durante el servicio, incluyendo laceraciones por los pelos de la cola. La hemospermia profusa es habitualmente asociada a defectos idiopáticos de la mucosa en la uretra proximal, que comunican con el cuerpo esponjoso (Schumacher et al., 1995; Varner et al., 2000). Las lesiones de habronemiasis cutánea en el proceso uretral también son causa frecuente de hemospermia (McKinnon et al., 1988), pero su frecuencia ha disminuido desde el uso de la ivermectina. Las uretritis bacterianas han sido reportadas como una causa común de hemospermia en padrillos (McKinnon et al., 1988; Voss and McKinnon, 1993). Los microorganismos más frecuentemente asociados son Streptococcus spp., E. coli, y Pseudomonas aeruginosa (Voss and Pickett, 1975).

El diagnostico es generalmente evidente pero es más difícil de detectar en padrillos en programas de monta natural, pero algunas veces es posible ver sangre saliendo de la vulva después del servicio. Para identificar el origen de la misma puede ser necesario el uso de vagina artificial (VA)con extremo abierto.

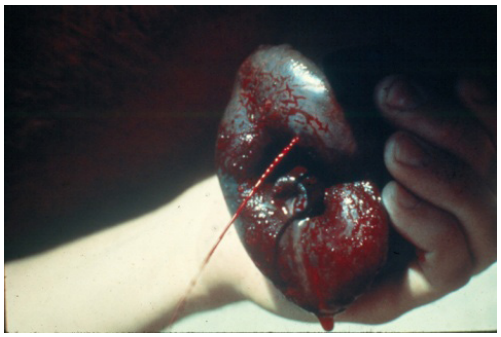
La hemospermia es controlable si es posible identificar y tratar la causa primaria de la misma. Los antibióticos sistémicos que tienen buenas concentraciones en el tracto urinario como la penicilina y Trimetoprim Sulfa (TMS) y los agentes acidificantes urinarios contribuyen a resolver muchos de los casos de uretritis. El reposo sexual es una de las primeras y más importantes medidas de manejo que deberían implementarse por al menos 14 días antes de colectar semen nuevamente. Las laceraciones de la mucosa de la uretra proximal responden bien a la uretrotomía (Schumacher et al., 1995). Esto ocasionalmente puede generar constricciones uretrales pero ha sido más asociado a uretrotomías por urolitiasis (Laverty et al., 1992). A nosotros nos ha resultado un excelente tratamiento.



Hemospermia significativa



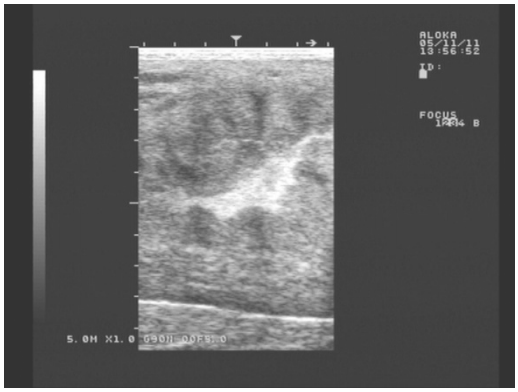
Hemospermia leve



Trauma del glande

Urospermia

La urospermia puede ser más difícil de diagnosticar comparada con la hemospermia en padrillos en servicio natural. Este problema puede evidenciarse inmediatamente luego de la colección de semen, pero de todos modos puede ser intermitente dificultando el diagnostico. La urospermia es más frecuente en padrillos con falla eyaculatoria.



Urospermia

En padrillos en los que se sospecha urospermia, hay que observar cuidadosamente la muestra seminal inmediatamente después de la monta. Esto puede revelar olor y a veces color, a orina. Algunos managers aseguran que pueden sentir un pulso "arenoso" cuando el padrillo eyacula. La ecografía de la yegua post-servicio es una técnica que puede utilizar-

se para diagnosticar la urospermia en servicios por monta natural. Típicamente es posible observar una acumulación de fluido hiperecoico con cristales de orina en el cuerpo del útero, de apariencia semejante a la típica refracción por presencia de aire.

Si cuando se examina la muestra seminal, existen dudas respecto a la presencia de orina, puede realizarse la detección de urea a través de las cintas marcadoras o bioquímica clínica.

"*Se realizo un experimento para evaluar tres kits comerciales: Azostix, Multistix y Uric-Acid Test, para la detección de orina en el eyaculado equino. Azostix, que es una prueba para nitrógeno ureico, consistentemente detecto orina en el eyaculado. La contaminación con orina fue evidente cuando ocurrió el cambio de color en la tira reactiva, virando del amarillo al verde luego de 10 segundos de exposición. La sensibilidad del Azostix a nitrógeno ureico en muestras contaminas fue de 39 mg/dl. La prueba Multistix también fue sensible para la detección de orina en semen. En esta prueba, la tira con nitrito cambio de amarillo a naranja luego de 3,5 minutos de exposición a semen contaminado con orina. La prueba de acido* úrico *no detecto orina en las muestras contaminadas. Consistentemente dio falsos positivos en todas las muestras de control. Los resultados de este estudio muestran que tanto Azostix como Multistix son métodos de diagnostico elegibles para detectar orina en el eyaculado de padrillos y además de bajo costo por análisis (U$ 1,25 por muestra)* (Althouse et al., 1989).

Las causas de urospermia en general son desconocidas por lo que se las denomina idiopáticas. Semejante a la eyaculación retrograda cuando el semen es eyaculado dentro de la vejiga (Brinsko, 2001). Afortunadamente esto es raro pero puede sospecharse cuando los padrillos parece que eyacularon pero no se encuentra semen en el recipiente colector. El sondeo de la vejiga revela grandes cantidades de espermatozoides (Brinsko, 2001).

"La eyaculación retrograda fue diagnosticada en un padrillo árabe de 10 años de edad. Además de las pautas de comportamiento compatibles con la eyaculación, el recipiente de colección permaneció sin semen en numerosas ocasiones. El sondeo de la vejiga revelo grandes cantidades de espermatozoides aun cuando se obtuviera un eyaculado. De todos modos es posible encontrar un bajo número de espermatozoides (< 1x106/ml) en la vejiga de padrillos normales post eyaculación. El examen endoscópico de la uretra, colículo seminal y vejiga no revelo anormalidades. El tratamiento médico con Clorhidrato de Imipramina aparentemente resulto exitoso al principio, pero no fue curativo. Posteriormente se decidió no proseguir con los diagnósticos y tratamientos y el caballo fue castrado. Para padrillos que tienen fallas eyaculatorias o que los eyaculados tienen baja cantidad seminal o menor número de espermatozoides que lo esperado, obtener una muestra de orina por sondaje vesical es un procedimiento diagnostico simple que puede utilizarse para investigar la posibilidad de eyaculación retrograda" (Brinsko, 2001).

La contaminación del semen con orina ha sido asociada a una disminución potencialmente reversible de la motilidad solo si se ha utilizado un diluyente que modifique los cambios osmóticos (Griggers et al., 2001). En el semen crudo los efectos deletéreos sobre la motilidad son más pronunciados que si la orina se encuentra diluida.

"La urospermia ha sido reportada como causa de infertilidad en numerosas especies. Los efectos deletéreos de la orina sobre los espermatozoides son debidos, en parte, a cambios en el pH y la osmolaridad. El semen fue colectado y sometido a varias condiciones de pH (experimento 1), de osmolaridad (experimento2) y varias cantidades y concentraciones de orina (experimento 3) y se registraron los efectos sobre la motilidad. Finalmente, el semen fue contaminado con orina y se le adicionaron, en diferentes grupos, dos diluyentes, con o sin centrifugación con el objetivo de corregir los efectos negativos de la orina sobre la motilidad (experimento 4). Los resultados de estos experimentos mostraron que las alteraciones en el pH y la osmolaridad afectaban negativamente la motilidad espermática. El

pH y la osmolaridad óptimos serian aproximadamente 7.7 y 315, respectivamente. La contaminación del eyaculado con orina, disminuye significativamente la motilidad espermática. Pequeñas cantidades de orina diluida fueron menos deletéreas que grandes cantidades diluidas y la orina concentrada fue más dañina que la diluida. La adición de diluyentes restauro la motilidad del semen contaminado con orina a valores semejantes a los controles no contaminados y la centrifugación para remover la orina no presento ventajas significativas" (Griggers et al., 2001).

El manejo de la urospermia es simple en algunos casos. Entrenar al padrillo a orinar adecuadamente antes del servicio ha funcionado bien en muchos casos en nuestra experiencia. La imipramina y otras drogas han mostrado resultados promisorios pero no consistentes y tampoco efectos prologados (Sepulveda et al., 1999; Turner et al., 1995). En programas de IA, la colección fraccionada del semen puede funcionar dado que normalmente la orina es producida al final de la eyaculación. La excepción es cuando los padrillos tienen además, problemas de servicio o de monta.

Desafortunadamente, cuando un padrillo comienza a orinar su eyaculado la tendencia es a continuar haciéndolo.

Fraccion espermática del eyaculado

Orina producida al final de la eyaculación

Piospermia

La piospermia se define como pus o leucocitos en el eyaculado (con más o menos detritus). No es raro que ocurra. Cuando se detecta piospermia sea macroscópica o microscópicamente lo común es asociarlo a vesiculitis u orquitis (raramente asociado también a epididimitis). Es muy raro que una infección superficial del tracto reproductivo termine en piospermia.

El examen de las fracciones del eyaculado puede ayudar a identificar donde se origina la infección. Si está afectada la fracción de liquido pre-eyaculatorio, entonces se puede sospechar de una infección de la uretra o mas infrecuentemente, de las glándulas bulbouretrales. Si hay leucocitos en la fracción seminal, esto sugiere orquitis, epididimitis o ampulitis. La fracción rica espermática está compuesta principalmente por fluidos originados en los testículos, epidídimos y ámpulas con una contribución mínima de las glándulas vesiculares, próstata o glándulas bulbouretrales. Leucocitos en la fracción gel sugiere un problema de vesiculitis.

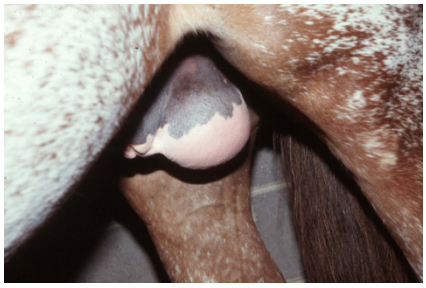
El examen citológico de muestras obtenidas de la vagina de la yegua post monta natural no es un indicador preciso dado que puede estar contaminada con material proveniente de la vagina. Si las muestras para citología son evaluadas sin teñir, los resultados pueden ser confusos dado que se pueden confundir espermátidas (células redondeadas) con leucocitos.

El tratamiento de la piospermia depende de la ubicación de la infección. En casos de orquitis bacterianas, en nuestra experiencia, la hemi-castracion resuelve el problema, además de una terapia antibiótica agresiva. Los clínicos deberían tener cuidado con el Muermo (Pseudomonas mallei) que también puede causar orquitis (Mohammad et al., 1989). El tratamiento de la epididimitis puede ser sistémico con antibióticos si es identificado precozmente, de todos modos en general es necesaria la castración unilateral (Brinsko et al., 1992; Held et al., 1990; Traub-Dargatz et al., 1991b). La vesiculitis se discute más adelante. La uretritis puede ser tratada con reposo sexual, acidificantes urinarios y/o antibióticos tópicos o sistémicos que se concentren en el tracto urinario (Sertich et al., 1998; Voss and Pickett, 1975).

ANORMALIDADES DE LOS TESTÍCULOS

Neoplasias

La incidencia de neoplasias de los testículos de los padrillos posiblemente sea una condición difícil de determinar debido a que la mayoría de los caballos se castran. De todos modos, el seminoma es uno de los tumores que ocurren con cierta frecuencia. Otras neoplasias reportadas son las de las células de Sertoli, de Leydig y teratomas. El seminoma es uno de los más frecuentes y se reconoce cuando el encargado o el propietario detectan un incremento del tamaño de uno de los testículos. En general no producen dolor ni tienden a hacer metástasis. Los padrillos responden bien a la hemi-castracion. Los teratomas son más frecuentes en los testículos retenidos en el abdomen.



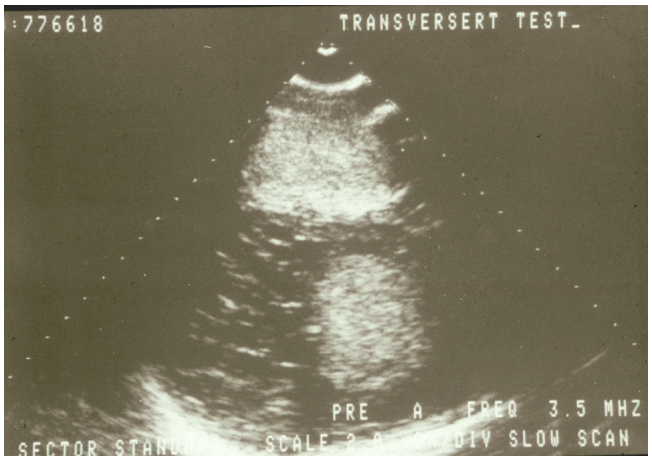
Testículo aumentado de tamaño

Seminoma

Trauma

El trauma es una de las causas más frecuentes de problemas testiculares en los padrillos. Habitualmente está asociado al acto de la monta y los efectos sobre la producción espermática no son inmediatos por el hecho en sí, sino por el incremento en la temperatura local y la inflamación. No esperamos cambios inmediatos en el espermograma asociados a un trauma por aproximadamente 7 días (afectando a los espermatozoides que todavía no han completado sus cambios y se encuentran en el en el proceso de maduración final en el epidídimo). Luego, podemos ver una disminución en la cantidad de espermatozoides y en la motilidad progresiva y un incremento en las anormalidades morfológicas (Friedman et al., 1990). El tiempo de permanencia de estos patrones depende del grado de injuria y de factores a mediano y largo plazo asociados con la cicatrización, edema, fibrosis, factores autoinmunes relacionados al daño de la barrera hematotesticular, etc. La ultrasonografia es una excelente herramienta para determinar el grado de daño y compromiso.

El rol del Veterinario es instaurar una terapia agresiva que minimice la injuria térmica y la inflamación lo antes posible. La hidroterapia, antiinflamatorios y antibióticos son imprescindibles como parte del plan de trabajo para minimizar el daño. Es importante el hielo para disminuir la inflamación y la injuria térmica. Están indicados Los antiinflamatorios no esteroidales (AINES) como la Fenilbutazona (4,4 mg/kg VO o EV) y Meglumina de Flunixin (1,1 mg/kg EV).



Orquitis

Las orquitis infecciosas son generalmente unilaterales, a menos que estén asociadas a peritonits. El testículo afectado está caliente, con dolor e inflamado.

La ultrasonografia es muy útil para el diagnostico y monitoreo del tratamiento. Ocasionalmente la terapia sistémica con antibióticos puede revertir los efectos de la orquitis, pero raramente si se ha desarrollado un absceso intratesticular. La hemi-castracion es la mejor opción en estos casos.

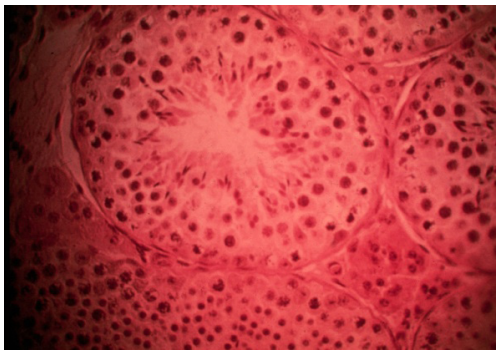
Degeneración

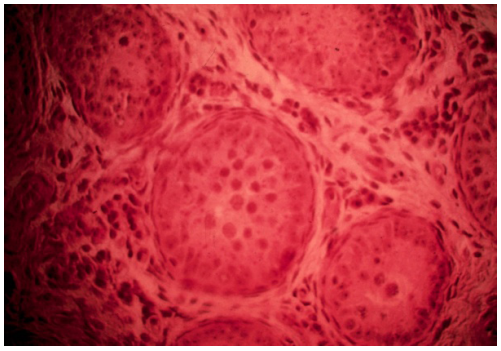
La degeneración testicular puede ser temporaria o permanente. En general es una condición secundaria resultante de una injuria testicular, por lo que la prevención de la misma está asociada a un reconocimiento precoz y una terapia apropiada agresiva.

La degeneración testicular es una atrofia adquirida uni o bilateral de los túbulos seminíferos, que resulta en una disminución de la producción y calidad espermática, y del volumen testicular, distinguible de la hipoplasia solo por la historia, antecedentes y datos anteriores de tamaño y función testicular.

El diagnostico se hace por evaluación seminal. Son necesarias muestras seriadas para confirmar la disminución de la eficiencia espermatogénica y determinar si esta es reversible o el resultado de una degeneración permanente.

La confirmación definitiva puede realizarse por biopsia e histopatología. El riesgo principal de la biopsia es de hemorragia, incremento de la presión intratesticular, adherencias entre la parietal y túnica vaginal visceral y ruptura de la barrera hematotesticular generando una reacción inmuno-mediada. Estas complicaciones tienen el potencial de inducir degeneración testicular si todavía no está presente.





Anormalidades del escroto

Hidrocele

Hidrocele es la acumulación de fluido en la cavidad vaginal (entre la túnica vaginal parietal y visceral del escroto). Puede ser normal (frecuente) debido a la comunicación directa con el peritoneo o asociada a patologías como traumas, mal drenaje linfático o neoplasia. Una pequeña cantidad de fluido rodeando la túnica vaginal, con una profundidad de 5 a 10 mm puede ser normal. En esas circunstancias el fluido puede rodear la cola del epidídimo. La presencia de fibrina o aumento de la ecogenicidad son para preocuparse. A veces se puede formar un hidrocele post castración y parece que el testículo no se hubiera sacado.

Hematocele

El hematocele es la acumulación de sangre en la cavidad vaginal. Esto es en general asociado a un trauma y la terapia debería orientarse como en ese caso (ver imagen de trauma testicular). El lavaje de la túnica vaginal debe orientarse a reducir la formación de adherencias (Blanchard et al., 1996). La ultrasonografía puede identificar la turbidez y remolinos de sangre. Si se confirma la ruptura testicular por ultrasonografía, se recomienda la castración unilateral.

ANORMALIDADES DEL CORDÓN ESPERMÁTICO

Torsión

El eje mayor del testículo es horizontal (no vertical como en el toro) y la cola del epidídimo se encuentra en el polo caudal. Un testículo puede rotar más de 180 grados sin signos clínicos y puede ser normal en algunos padrillos. En general, una rotación de 180 grados no es permanente en padrillos jóvenes (menos de 3 años) y tiende a ser permanente en padrillos de más edad, probablemente debido a los efectos de las migraciones de *Strongylus edentatus*, produciendo adherencias entre las túnicas parietal y visceral (Smith, 1973). Las torsiones testiculares mayores a 180 grados pueden producir compromiso vascular. Estas pueden reconocerse por dolor escrotal y pueden ser asociadas a cólico ((Horney and Barker, 1975; Threlfall et al., 1990). La ultrasonografía Doppler color puede ser una herramienta diagnostica de gran utilidad. Nosotros la utilizamos en muchos problemas que involucren lesiones vasculares.

"Un padrillo fue derivado para una evaluación debido a un aumento del tamaño escrotal unilateral y signos de dolor. La primera evaluación fue seguida de otras semejantes en forma recurrente

durante los próximos 3 años. Luego de la hemi-castración izquierda debido a una rotación testicular, el padrillo volvió a los servicios. La tasa de preñez de la temporada siguiente fue de 82%. Dos años después de la cirugía inicial el padrillo fue nuevamente evaluado por signos clínicos de un proceso agudo de dolor y aumento de tamaño escrotal derecho. Fue diagnosticada y corregida una torsión testicular y el testículo suturado en el lugar. La tasa de preñez en la temporada siguiente fue superior a 90% (Threlfall et al., 1990).

El diagnostico diferencial más importante es con la hernia escrotal y debería ser diferenciado mediante ultrasonografía y exploración del anillo inguinal interno.

En general el testículo suele ser extirpado, pero ocasionalmente puede separarse y realizar una transfixión (Threlfall et al., 1990).

ANORMALIDADES DEL PENE Y PREPUCIO

Infección

Las infecciones bacterianas genitales de los padrillos son algo importante a tener en cuenta. Las epidemias recientes de Metritis Contagiosa Equina en Estados Unidos revelan las grandes dificultades para manejarlas. Esto no será discutido en esta presentación.

La más frecuente (y obvia) infección del pene y prepucio es el Exantema Coital producido por el Herpes Virus Equino 3. El Exantema Coital es una enfermedad venérea auto limitante de gran diseminación entre padrillos y yeguas en programas de monta natural. Ocasionalmente también puede ser transmitida entre yeguas por el examen trans-rectal aun cambiando el guante, posiblemente a través del transductor del cecógrafo. El periodo de incubación es corto (2 a 7 días) y a veces puede causar problemas en los padrillos debido al dolor, disminuyendo la libido. Solo muy raramente ha sido asociado con subfertilidad a largo plazo.

ANORMALIDADES DEL EPIDÍDIMO

Epididimitis

La epididimitis es generalmente de origen bacteriano, rara vez es una condición primaria y frecuentemente es asociada a orquitis. Es común observar signos clínicos recurrentes de dolor abdominal o inguinal, letargia, subfertilidad y un epidídimo aumentado de tamaño y doloroso. Los hallazgos ecográficos incluyen áreas hipo e hiperecoicas alrededor del tejido epididimario (Held et al., 1990; Traub-Dargatz et al., 1991a). En el eyaculado pueden verse muchas células inflamatorias y los cultivos en general revelan *Streptococcus zooepidemicus*. En casos agudos debe instaurarse tratamiento con antibióticos. El pronóstico para la fertilidad posterior a una epididimitis es malo y aun después de la hemi-castracion en padrillos afectados unilateralmente, es posible obtener un cultivo positivo meses después de extirpar el epidídimo afectado (Held et al., 1990).

ANORMALIDADES DE LAS GLÁNDULAS ACCESORIAS

Vesiculitis

La vesiculitis es en general un problema frustrante para tratar. El caso que se presenta a continuación, de criopreservacion de semen de un padrillo con vesicultis ilustra nuestro conocimiento y manejo de este problema (Fennell et al., 2012)

La colección de semen y criopreservacion ofrecen muchas ventajas sobre la monta natural en la prevención de la transmisión de organismos patógenos entre yeguas y padrillos (Couto and Hughes 1993). Si bien la vesiculitis es infrecuente en el padrillo, las glándulas vesiculares con las más susceptibles a infecciones de todas las glándulas accesorias (Varner et al. 2000). Las glándulas vesiculares son bolsas huecas alargadas de 15 a 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro, localizadas inmediatamente hacia lateral y distal de las ámpulas, desembocando en la uretra, en el *colliculus seminalis* (Amann 1993a). Ellas son las responsables de la producción y almacenamiento del gel, que es la ultima fracción del eyaculado (Amann 1993b). El tratamiento de la vesicuitis es particularmente desafiante debido a lo persistente de la infección y la reducción de la fertilidad asociada a la misma (Varner et al. 2000).

Un padrillo de salto de 6 años, que previamente había cubierto un pequeño número de yeguas por monta natural, fue recibido para un programa de criopreservación de semen. El examen clínico inicial no revelo ninguna anormalidad. Los testículos se palparon como normales y el volumen escrotal fue de 122 mm. Al día 12 post admisión, el padrillo produjo un eyaculado purulento con detritus y sangre. Se colecto semen nuevamente 6 horas después y el eyaculado tuvo las mismas características. El material purulento se observo al mi-

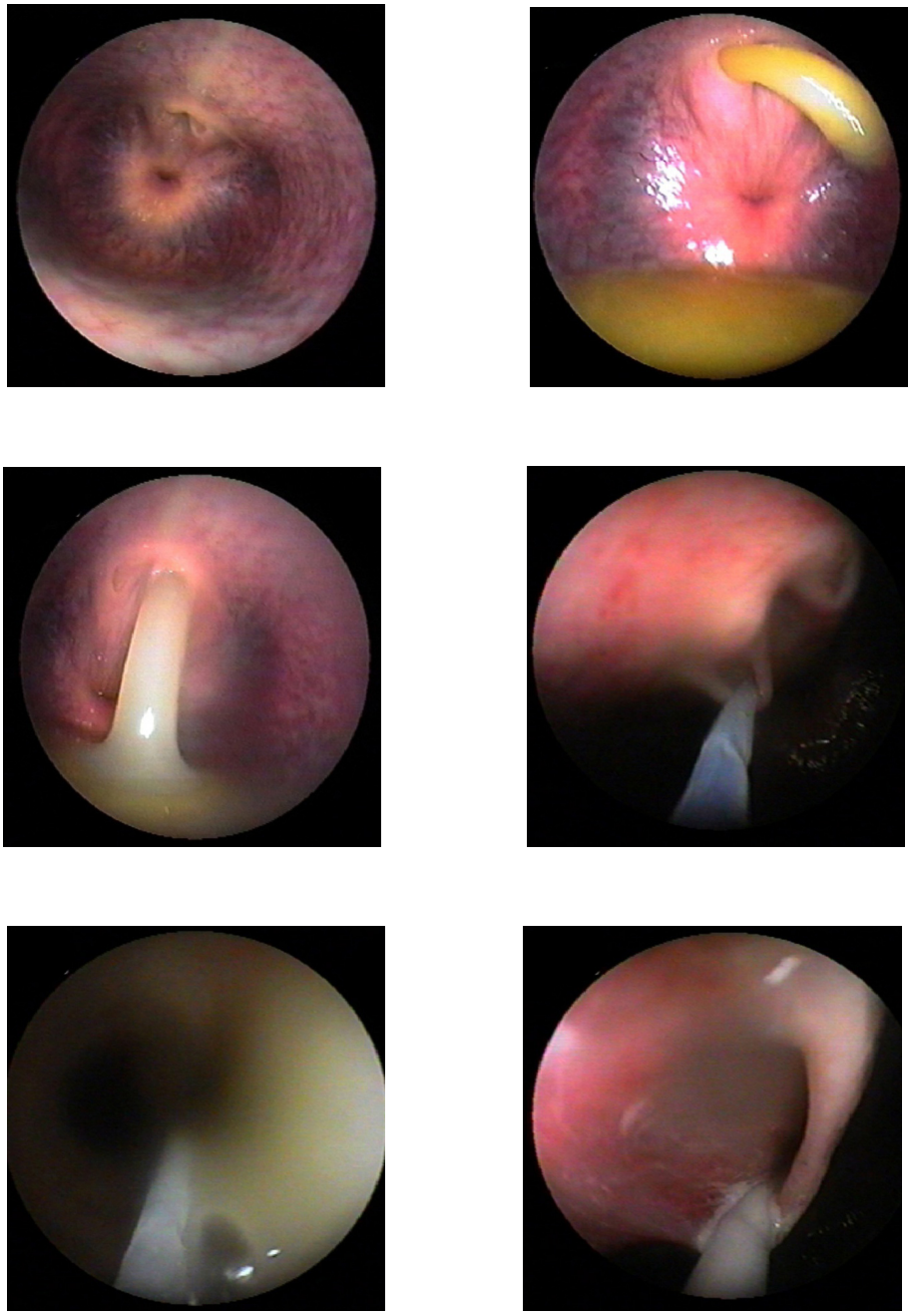
croscopio y se evidencio una predominancia de neutrófilos (92%) y 8% de mononucleares. Se aisló un *Streptococcus* grupo C en pureza, sensible a penicilina, ceftiofur y Trimetoprim/ Sulfonamida (TMPS). El examen físico no revelo anormalidades y tampoco la hematología y bioquímica clínica. La palpación transrectal y ecografía de las glándulas vesiculares tampoco revelo anormalidades y las dos glándulas tenían semejante tamaño, consistencia y ecogenicidad.

The urethral mucosa, urethral orifice and colliculus seminalis appeared normal

La mucosa y orificio uretral y el *colliculus seminalis* tenían una apariencia normal a la video endoscopía. La glándula vesicular izquierda fue masajeada por vía transrectal para facilitar la liberación de fluido vesicular, que apareció de un color amarillo oscuro. El endoscopio fue introducido en el lumen de la glándula izquierda y se observo una mucosa normal cubierta de fluido oscuro. La apariencia del mismo, combinada con el cultivo y citología de los eyaculados confirmaron el diagnostico de vesiculitis de la glándula izquierda.

Se instituyo un tratamiento sistémico con penicilina procaínica y fenilbutazona durante 10 días. Además, se realizo un tratamiento local infiltrando ambas glándulas con 8 ml de penicilina procaínica en dos ocasiones separadas por 48 hs. El tratamiento continuó luego con TMPS por 14 días. Luego de 3 semanas de terapia con antibióticos sistémicos, se colecto semen para criopreservacion tomando muestras para cultivo y citología. No hubo crecimiento bacteriano ni presencia de leucocitos. Al pellet resultante de la centrifugación, con una concentración aproximada de 250 $x10^6$, se le agrego un diluyente de congelación que contenía yema de huevo, glicerol, ticarcilina (1mg/ml) y amicacina (0,5 mg/ml). Los eyaculados fueron congelados en pajuelas de 0,5 ml en un sistema automático programable. Veinticuatro horas post-colección, 2 pajuelas de cada eyaculado fueron descongeladas en agua a 38°C. Una muestra de cada una fue enviada al laboratorio para cultivos, que dieron negativos. La motilidad total post descongelación fue de 50-70% y la progresiva de 30-50%. Se congelaron 653 pajuelas, suficientes para unas 80 dosis, estimando que serian utilizadas 8 pajuelas por dosis con un total de 1000 millones de espermatozoides. Durante el programa de congelación, se colecto un eyaculado contaminado, de apariencia sanguinolenta y

purulenta. El cultivo dio un crecimiento moderado mixto de bacterias gran positivas y negativas. Posteriormente el padrillo fue utilizado en un programa de monta natural con 35 yeguas y un buen resultado de fertilidad.



Este caso indica que si bien es difícil curar padrillos con vesiculitis infecciosas, es posible manejarlos exitosamente como para además criopreservar su semen y obtener buenos resultados en monta natural. Los eyaculados congelados tuvieron buena motilidad progresiva post-descongelación (mayor al 30%), que podrían resultar en tasas de preñez aceptables mayores a 35% por ciclo (Samper 2001; Vidament 2005). Los padrillos con vesiculitis pueden presentar un amplio rango de signos clínicos. Algunos pueden mostrar resistencia para montar y eyacular o dolor durante la eyaculación (Varner et al. 1991b). De todos modos, lo

típico es que los padrillos no muestren signos clínicos, ni dolor en el servicio, ni cuando orinan o defecan (Varner et al. 2000). En el caso anterior, si bien el padrillo en general requería múltiples montas para eyacular en la VA, mostraba un comportamiento normal. El diagnostico de vesiculitis incluye un examen macroscópico y microscópico del eyaculado. Los hallazgos incluyen eyaculados sanguinolentos y/o purulentos y una gran predominancia de neutrófilos (Varner et al. 2000). El diagnostico de certeza incluye la localización de la infección en un lugar especifico del tracto urogenital. En estos casos la ecografía no es de mucha ayuda, pero de todos modos ha sido reportada como de mucha utilidad en diagnostico de vesiculitis en el padrillo (Little and Woods 1987; Malmgren and Sussemilch 1992; Pozor 2005) y en el toro (Mickelsen et al. 1994). En otros reportes no se encontraron diferencias palpables entre glándulas afectadas y no afectadas (Varner et al. 2000). En el padrillo del caso descripto, la visualización endoscópica del liquido oscuro en el lumen de la glándula izquierda junto a la citología con gran numero de neutrófilos en el semen, contribuyeron a la confirmación del diagnostico. Además, pueden realizarse otros procedimientos como la cateterización de las glándulas para obtener muestras para cultivo y citología. En este caso, el asilamiento de *Streptococcus* tipo C en el eyaculado podría haber contribuido a omitir este paso. El tratamiento de la infecciones de las gandulas accesorias es frecuentemente ingrato, y esto ha sido reportado además en otras especies (Blanchard et al. 1988; Cavalieri and Van Camp 1997; Wagenlehner et al. 2005). De hecho, hay muy pocos reportes de tratamientos efectivos. La vesiculectomía ha sido reportada como efectiva, tanto en el padrillo (Varner et al. 1993) como en el toro (Hooper et al. 1994). Desafortunadamente, las complicaciones incluyen hemorragia, hematomas y abscesos frecuentes (Cavalieri and Van Camp 1997). A pesar de esto, la técnica todavía es una opción viable para los padrillos que no responden al tratamiento médico, y las características seminales posteriores a la vesiculectomía parecen ser buenas (Klug et al. 1979). El tratamiento médico esta focalizado en una terapia antibiótica efectiva. La incapacidad de la mayoría de los antimicrobianos (AM) de penetrar en la glándula vesicular y mantener concentraciones inhibitorias mínimas en el sitio de infección es una de las causas principales de las fallas en los tratamientos (Blanchard et al. 1988; Varner et al. 1991b). Las características que deberían tener los AM para penetrar en las glándulas accesorias incluyen: alta solubilidad lipídica, bajo peso molecular, baja afinidad con proteínas plasmáticas y alto pKa (Wagenlehner et al. 2005). La gentamicina es incapaz de penetrar las glándulas vesiculares (Blanchard et al. 1988; Strezmienski et al.). Los tratamientos sistémicos con penicilina procaínica han sido eficaces para controlar esta condición en algunos padrillos (Pozor, M. 2006, pers. comm.). De todos modos TMPS también tiene características que le permiten obtener buenas concentraciones en las glándulas (Varner et al. 1993). La infiltración local con antibióticos es una muy buena ayuda para el tratamiento sistémico y puede contribuir a resolver problemas de baja penetración (Varner et al. 1993). Las bacterias más frecuentemente aisladas de vesiculitis son: *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus spp. Staphylococcus spp.* y *Brucella abortus* (Varner et al. 1991b). En el caso reportado, el agente etiológico, *Streptococcus* grupo C fue sensible a penicilina y TMPS entre otros, y estas dos drogas fueron seleccionadas para la terapia. En humanos, las fluoroquinolonas son las drogas de elección para las prostatitis crónicas bacterianas (Wagenlehner et al. 2005). Esto debido a su capacidad de penetración en las glándulas accesorias y la resistencia de los MO a los antibióticos. Se ha reconocido el potencial efecto deletreo de los AM sobre los espermatozoides (Hargreaves et al. 1998). De todos modos, un estudio sugiere que el tratamiento con TMPS no tuvo influencia sobre la motilidad (Bedford and McDonnell 1999). Por lo tanto, los tratamientos prolongados con TMPS pueden ser una buena opción para los padrillos infectados y que pueda continuar sus programas reproductivos. La inclusión de antibióticos a los diluyentes para semen refrigerado y congelado esta estandarizada como una medida para prevenir la transmisión de enfermedades (Loomis

2006). Es conocido que el semen debe ser expuesto a los antimicrobianos del diluyente por al menos 20 minutos para un control efectivo de las bacterias (Blanchard et al. 1987). Blanchard y col (1987), reportaron que inseminar yeguas con semen de padrillos infectados, transmite la infección al útero. Además, el estudio revelo que la inclusión de polimixina B al diluyente incremento significativamente las tasas de preñez en esas yeguas.

En este padrillo, el semen no se congelo hasta que tanto la apariencia como los cultivos y citologías fueran normales. Hallazgos similares han sido reportados en toros, en los cuales se realizo una terapia antimicrobiana para controlar los signos antes de criopreservar su semen (Cavalieri and Van Camp 1997). Más recientemente, se ha reportado la congelación exitosa de la fracción espermática del eyaculado (Katila et al. 2002). Se ha demostrado que los espermatozoides de padrillos con vesiculitis infecciosa raramente son afectados, a menos que se los exponga a liquido seminal infectado (Varner et al. 1991b). Así, la congelación de semen de padrillos infectados puede beneficiarse con el uso de la fracción espermática solamente, además de la terapia con antibióticos.

Este caso destaca el uso de las herramientas disponibles para el manejo de padrillos con vesiculits. Se ha demostrado que muchas enfermedades de los padrillos se pueden superar con el uso de técnicas de reproducción asistida (Varner et al. 1991a). En nuestro caso, un padrillo con vesiculitis infecciosa pudo ser manejado exitosamente con un tratamiento local y sistémico. Los eyaculados fueron congelados con la inclusión de antibióticos, como en la práctica de rutina. La transmisión de enfermedades puede prevenirse con la utilización criteriosa de antimicrobianos en los diluyentes combinados con técnicas de mínima contaminación. Además, el análisis de los eyaculados antes del servicio contribuye a monitorear la calidad seminal.

REFERENCIAS

1. Althouse, G. C., S. W. J. Seager, D. D. Varner, and G. W. Webb. 1989. Diagnostic aids for the detection of urine in the equine ejaculate. Theriogenology 31:1141-1148.
2. Bedford, S. J., S. M. McDonnell, E. Tulleners, D. King, and P. Habecker. Squamous cell carcinoma of the urethral process in a horse with hemospermia and self-mutilation behavior. J Amer Vet Med Assn 216[4], 551. 2000.
3. Ref Type: Journal (Full)
4. Blanchard, T. L., D. D. Varner, and S. P. Brinsko. 1996. Theriogenology question of the month. Scrotal hematocele. J Am Vet Med Assoc 209:2013-2014.
5. Brinsko, S. P. Retrograde ejaculation in a stallion. J Amer Vet Med Assn 218[4], 551. 2001.
6. Ref Type: Journal (Full)
7. Brinsko, S. P., D. D. Varner, T. L. Blanchard, R. L. Relford, and L. Johnson. 1992. Bilateral infectious epididymitis in a stallion. Equine Vet J 24:325-328.
8. Fennell, L. C., A. O. McKinnon, and C. J. Savage. 2010. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. Equine Vet Educ 22:215-219.
9. Friedman, R., M. Scott, S. E. Heath, J. P. Hughes, P. F. Daels, and T. Tran. 1990. Seminal characteristics of stallions with transitory testicular impairment. Proc. AAEP3-13.
10. Griggers, S., D. L. Paccamonti, R. A. Thompson, and B. E. Eilts. 2001. The effects of ph, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. Theriogenology 56:613-622.
11. Held, J. P., S. Adair, M. D. McGavin, W. H. Adams, R. Toal, and J. Henton. 1990. Bacterial epididymitis in two stallions. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197:602-604.

12. Horney, F. D. and C. A. V. Barker. 1975. Torsion of the testicle in a standardbred. Can. Vet. J. 16:272-273.
13. Laverty, S., J. R. Pascoe, G. V. Ling, J. P. Lavoie, and A. L. Ruby. 1992. Urolithiasis in 68 horses. Vet. Surg. 21:56-62.
14. McKinnon, A. O., J. L. Voss, G. W. Trotter, B. W. Pickett, R. K. Shideler, and E. L. Squires. 1988. Hemospermia of the stallion. Equine. Pract. 10:17-23.
15. Mohammad, T. J., M. I. Sawa, and Y. A. Singh. 1989. Orchitis in Arab stallion due to Pseudomonas mallei. Indian Journal Of Veterinary Medicine 9:15-17.
16. Schumacher, J., D. D. Varner, D. G. Schmitz, and T. L. Blanchard. 1995. Urethral defects in geldings with hematuria and stallions with hemospermia. Vet Surg 24:250-254.
17. Sepulveda, M. H., G. Q. Rocha, G. W. Brumbaugh, J. Montiel, S. Rodriguez, and E. C. deMorales. 1999. Lack of beneficial effects of bethanechol, imipramine or furosemide on seminal plasma of three stallions with urospermia. Reprod Domest. Anim 34:489-493.
18. Sertich, P. L., M. A. Pozor, S. A. Meyers, and J. S. Brown. 1998. Medical-Management of Urinary Calculi in a Stallion with Breeding Dysfunction. J Amer. Vet Med Assn. 213:843.
19. Smith, J. A. 1973. The occurrence of larvae of Strongylus edentatus in the testicles of stallions. Vet. Rec. 93:604-606.
20. Sojka, J. E. and G. K. Carter. 1985. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. Compendium. on. Cont. Ed. 7:587-590.
21. Threlfall, W. R., C. L. Carleton, J. Robertson, T. Rosol, and A. Gabel. 1990. Recurrent torsion of the spermatic cord and scrotal testis in a stallion. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196:1641-1643.
22. Traub-Dargatz, J. L., G. W. Trotter, B. Kaser-Hotz, D. G. Bennett, M. L. Kiper, D. N. Veeramachaneni, and E. Squires. 1991a. Ultrasonographic detection of chronic epididymitis in a stallion. J Am Vet Med Assoc 198:1417-1420.
23. Traub-Dargatz, J. L., G. W. Trotter, B. Kaser-Hotz, D. G. Bennett, M. L. Kiper, VeeramachaneniDN, and E. Squires. 1991b. Ultrasonographic detection of chronic epididymitis in a stallion. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198:1417-1420.
24. Turner, R. M. O., C. C. Love, S. M. McDonnell, R. W. Sweeney, E. D. Twitchell, P. L. Habecker, L. K. Reilly, M. A. Pozor, and R. M. Kenney. 1995. Use of Imipramine Hydrochloride for Treatment of Urospermia in a Stallion with a Dysfunctional Bladder. J. Amer. Vet. Med. Assn. 207:1602.
25. Varner, D. D., T. L. Blanchard, S. P. Brinsko, C. C. Love, T. S. Taylor, and L. Johnson. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. Anim Reprod Sci 60-61:493-509.
26. Voss, J. L. and A. O. McKinnon. 1993. Hemospermia and urospermia. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 864-870. Lea & Febiger, Philadelphia, London.
27. Voss, J. L. and B. W. Pickett. 1975. Diagnosis and treatment of haemospermia in the stallion. J. Reprod. Fertil. Suppl151-154.

Uterine abnormalities

AO McKinnon[1]*, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT; and PM McCue*[2]*, DVM, PhD, Dip ACT*

[1]*Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia;* [2] *Animal Reproduction an Biotechnology, Colorado State University, Fort Collins, Co, USA*

With ultrasonography the uterus can be examined non-invasively to evaluate normal reproductive anatomy, detect pathologic changes, and monitor therapeutic regimen(s). The most common forms of uterine pathology detected by ultrasonography in the non pregnant mare are accumulations of intrauterine fluid, inflammatory changes, uterine cysts and air. Less commonly, foreign bodies, fetal remnants, debris, abscessation, persistent endometrial cups, and neoplastic conditions are observed. Applications of ultrasonography to peri-parturient conditions have demonstrated it's usefulness in examining mares with problems such as placentitis and post partum hemorrhage. Each year we see pregnant mares presented for either reproductive evaluation or breeding that have been mistakenly been diagnosed as not pregnant during the previous breeding season. The reasons for this are varied but commonly this occurs when the only pregnancy test is completed at day 13-15 post breeding and the mare is not examined again. Ultrasonographical evaluation of the uterus will identify the pregnancy and will help avoid an inappropriate internal evaluation and iatrogenic abortion.

INFLAMMATION OF THE UTERUS

Inflammatory changes in the mares' uterus are recognized by the presence of uterine fluid (see below) and/or markedly increased edema of the endometrium (endometrial folds). During the normal estrus cycle endometrial edema is detected as a normal development and follows the pattern of estrogen production and thus similar to estrogen, uterine edema peaks approximately 24 hours prior to ovulation(Hayes et al., 1985; McKinnon et al., 1987b). Edema of the endometrium is graded from 1 to 3 as a normal development during the estrus cycle(McKinnon et al., 1987b). Typically edema is minimal or absent close to ovulation and when multiple frequent examinations are performed a change from grade 3 to grade 1 or no edema is quite useful to predict impending ovulation(McKinnon et al., 1987b; Samper, 1997). When edema is detected in mares that are in diestrus or pregnant, or when edema is marked (>grade3) it is a sign of inflammation (Fig 1a-d). Some uterine edema of the dorsal surface of the uterus in pregnant mares is normal between days 17 and 30 and is associated with increased tone, fixation and local production of estrogens from the conceptus(Griffin et al., 1993). Marked edema (grade 4) can mask the presence of smaller amounts of intrauterine fluid. On occasion, systemic administration of 20-30mg of dexamethasone phosphate can result in a spectacular reduction of edema from grade 4 to grade 1 or even to non detectable within an hour.

See pictures on page 97 - 98

UTERINE FLUID

Ultrasonography is extremely valuable for estimating quantity and quality of fluid in the uterine lumen. Palpation of the uterus per rectum is only accurate when quantity of intrauterine fluid is large (> 100 ml) and(or) when uterine tonicity changes. Confirmation of smaller volumes of intrauterine fluid, without invasive techniques such as lavage and cytological analysis, was difficult until direct, non-invasive visualization was made possible with ultrasonography. Volumes of fluid within the uterine lumen are estimated (graded as very small, small, medium, large or excessive) with ultrasonography and quality is graded from 1 to 4 according to degree of echogenicity(McKinnon et al., 1988)(Fig 2a-d). Degree of echogenicity is related to amount of debris or white blood cell infiltration into the fluid. Grade 1 fluid has large numbers of neutrophils and grade 4 has very few neutrophils when echogenicity is related to inflammation.

Some other forms of uterine fluid detected are urine, blood, mucus, biofilm and a transudate associated with uterine edema (Fig 2e-l).

Pyometra refers to an accumulation of purulent material within the lumen of the uterus and typically is identified by ultrasonography as a grossly enlarged uterus, filled with echogenic fluid and a thickened uterine wall (Fig 2m). The degree of uterine thickening may be masked in instances of excessive fluid accumulation and distension but is appreciated when the uterus is drained. Large accumulations of fluid may be associated with physical obstruction or functional defects of the cervix. An intermittent vaginal discharge may be evident if the cervix is patent. Affected mares are usually not systemically ill and clinical signs such as septicemia, depression or anorexia are absent. Hematologic changes are minimal when present. Endometrial damage due to the chronic inflammation may result in failure of prostaglandin secretion and persistence of the corpus luteum. Diagnosis is based on palpation and ultrasonography of the reproductive tract per rectum, and speculum examination, as well as culture and cytology if the cervix is patent.

The prognosis for future fertility is poor and in most instances treatment is aimed at salvaging the mare for nonbreeding purposes.

Urine in the uterus may result from vesico-vaginal reflux and subsequent flow forward through an open cervix and may also occur from contamination by a stallion that has urospermia. Urospermia results in an immediate decline in spermatozoal motility(Griggers et al., 2001) and thus impact fertility. In addition urine in the uterus (Fig 2e) creates a chemical endometritis and if it persists will interfere with maintenance of pregnancy. Urine in the mares' uterus is identified by hyperechoic accumulations most commonly at the corpus corneal junction and will not swirl easily when balloted with the probe. The echogenicity of the urine is thought to be from a combination of crystals and mucus. Urine in the uterus should be removed with voluminous lavage.

Observations on quality and quantity of uterine fluid have been used to assess efficacy of various therapeutic procedures on individual animals treated for naturally occurring endometritis(Causey, 2006; McKinnon and Voss, 1993; Pycock, 1994; Pycock and Newcombe, 1996). Experiments(Adams et al., 1987; Ginther et al., 1985; Knutti et al., 2000; Malschitzky et al., 2002; Malschitzky et al., 2003a; Malschitzky et al., 2003b; McKinnon et al., 1987a; McKinnon et al., 1988; Nikolakopoulos and Watson, 1999; Ozgen et al., 2002; Pycock, 1994; Pycock and Newcombe, 1996; Schilela et al., 2001; Troedsson, 1997; Watson et al., 2001) have been conducted to determine the relationship of intrauterine fluid to fertility .

Some areas where recognition of intrauterine fluid may be of particular value are 1) evaluation of the post partum mare, 2) diagnosis and treatment of persistent mating in-

duced endometritis, 3) diagnosis and treatment of infectious endometritis and 4) effects on pregnancy rate and early embryonic death (EED).

Ultrasonography can also be valuable as a diagnostic aid during a therapeutic uterine lavage procedure when fluid recovery is difficult (Fig 2n). A majority of cases involve older mares in which the most dependent part of the uterus is located cranial and ventral to the pelvic brim. The location of the fluid pocket is noted, the cuff of the lavage catheter is deflated and the catheter is advanced into the pool of accumulated fluid. In some instances it may be necessary to infuse approximately 500 mls of lavage fluid (i.e. lactated Ringer's solution) to distend the uterus prior to advancing the catheter.

See pictures on page 99 - 100 - 101 - 102 - 103 - 104

ULTRASONOGRAPHIC STUDIES OF THE UTERUS AFTER PARTURITION

In the equine industry, economic incentives influence breeders to attempt a foaling interval of 12 months or less. This commonly necessitates breeding of mares during the first post-partum estrus. However, fertility has been reported to be lower in mares bred during the first post-partum ovulatory period compared with mares bred during subsequent cycles(Ishii et al., 2001; Lowis and Hyland, 1991; Merkt and Gunzel, 1979; Sullivan et al., 1975; Woods et al., 1987), and early embryonic death has been reported higher for mares bred at this time(Lieux, 1980; Lowis and Hyland, 1991; Merkt and Gunzel, 1979; Platt, 1973). This decreased fertility may be due to failure of elimination of microbes during uterine involution, introduction of microbes at breeding, or inadequate endometrial repair relative to when the embryo enters the uterus. In addition, presence of uterine fluid during estrus and diestrus has been shown to reduce fertility of mares(Adams et al., 1987; McKinnon et al., 1987a; McKinnon et al., 1988).

A study(McKinnon et al., 1988) was conducted to evaluate two hypotheses: 1) uterine involution and fluid accumulation could be effectively monitored with ultrasonography and used to predict fertility of mares bred during the first post-partum ovulatory cycle, and 2) delaying ovulation with a progestin would result in improved pregnancy rates in mares bred during the first post-partum ovulatory period. The previously gravid horn was larger than the non-gravid horn for a mean of 21 days (range 15 to 25) after parturition. Uterine involution was most obvious at the corpus cornual junction. When the results of three ultrasonographic scans performed over a 5-day period were similar,the uterus was considered to be involuted. On the average, uterine involution was completed by day 23 (range 13 to 29). Quantity and quality of uterine fluid were not affected by progestin treatment. Number of mares with detectable uterine fluid decreased after day 5 post-partum. Uterine fluid generally decreased in quantity and improved in quality between days 3 and day 15. Fewer ($P < 0.005$) mares became pregnant when uterine fluid was present during the first post-partum ovulatory period (3 of 9, 33%), compared to when no fluid was detected (26 of 31, 84%). Mares with uterine fluid during breeding did not have appreciably larger uterine dimensions, compared with those mares not having fluid. There was no relationship between uterine size on day of ovulation and pregnancy rate. Ovulation was delayed, and pregnancy rates improved in progestin-treated mares. More ($P < 0.05$) mares became pregnant (23/28, 82%) when they ovulated after day 15, in the first post-partum ovulatory period, than mares that ovulated before day 15 (6/12, 50%). This study demonstrated that ultrasonography was useful in detecting mares with post-partum uterine fluid and can be used to aid in determining whether a mare should be bred and/or treated during the first post-partum ovulatory period(McKinnon et al., 1988).

Uterine fluid may be spermicidal during estrus and an excellent medium to support bacterial proliferation at any time. In addition fluid may indicate poor uterine involution. When fluid is present during dioestrus, it may be associated with infectious endometritis and be associated with premature luteolysis or early embryonic death(Adams et al., 1987). Quantity of uterine fluid during the first post-partum ovulatory period appeared to be related to stage of uterine involution, and was reduced or eliminated by delaying the ovulatory period with progestins(McKinnon et al., 1988). Progestin treatment not only allowed time for elimination of uterine fluid before the first post-partum ovulation, but it also significantly delayed the first post-partum ovulation. Progestagen treatment has been demonstrated to delay onset of the first post-partum ovulatory period without affecting the rate of uterine involution(Loy et al., 1982; McKinnon et al., 1988; Pope et al., 1979; Sexton and Bristol, 1985). Long-term progestin administration to normal, cycling mares has not been shown to adversely affect fertility(Squires et al., 1983). However, treatment with progestins will affect uterine defense mechanisms(Evans et al., 1986; Winter, 1982) and thus care is recommended before prolonged progestin treatment is administered to post-partum mares or mares susceptible to infection. Since there were decreased pregnancy rates associated with uterine fluid, and increased pregnancy rates as ovulation was delayed, it was suggested both techniques could be used to manipulate breeding strategies and improve pregnancy rates from normal mares bred during the first post-partum ovulatory period(McKinnon et al., 1988).

Further studies on post partum intrauterine fluid has demonstrated that mares that show uterine fluid accumulation during foal-heat also present a larger incidence of post-breeding fluid accumulation and that treatments of mares with oxytocin did not decrease the incidence of post-breeding fluid accumulation or improve pregnancy rates. Uterine flushes performed 36-48 h after breeding in mares with uterine fluid after foal-heat ovulation also did not improve pregnancy rates (Schilela et al., 2001). In another study early embryonic death rates were significantly greater ($p=0.015$) in mares with intrauterine fluid accumulation during foal-heat (30.5%) than in mares without fluid accumulation (11.1%)(Malschitzky et al., 2003a).

A study from Australia clearly showed the generally held contention that fertility is poorer and embryonic death greater when mares are bred on foal heat compared to the next cycle that was induced by prostaglandin(Lowis and Hyland, 1991). First cycle pregnancy rates were 47.9% compared with 55.2% and overall pregnancy rates at the end of the breeding season were 83.3% and 89.7% respectively. Pregnancy losses before day 45 were 10% and 3.9% and after day 45 were 9.3% and 3.6% respectively(Lowis and Hyland, 1991).

Results of clinical, microbiological and hormonal examinations performed during the puerperal period provide useful information when deciding whether to use the foal heat for breeding or to initiate a therapy during this period of time(Glatzel and Belz, 1995). Interpretation of results of lavage or other post partum treatments(Blanchard et al., 1989; McCue and Hughes, 1990) should be viewed with caution when all mares are treated in different groups because most mares do not need treatment in the immediate post partum period and our aims should be to identify those that do need treatment.

Foal heat breeding strategies.

Mares can be considered for a foal heat breeding if they had a normal foaling (i.e. no dystocia), fetal membranes were not retained, and there was no prolonged discharge of fluid (lochia) from the uterus.

1. All mares are examined at day 2-3 post foaling. By that time problems that may have occurred during foaling will be identified. We believe that this exam is critical if we are to prevent mares from becoming "problem broodmares". Each year we identify mares that if inappropriately treated could become long term disasters. Approximately 5% of mares will have placental tags present (despite excellent staff management) and another 5% will have problems with metritis and uterine damage. Many (15%) will have delayed involution suggested by increased size of the uterus and volume of fluids present. Such mares are treated aggressively with large volume uterine lavage and ecbolics, antibiotics and anti-inflammatories and monitored closely.
2. Post-partum mares may be treated with an infusion of antibiotics in lactated Ringers solution (LRS) 2-3 days after foaling. This may help some individual mares and may prevent iatrogenic contamination.
3. Mares with no abnormalities identified are scheduled to be re-examined on Day 9-10 post foaling. Mares will not be bred any earlier than Day10. On day 9-10 if the mare has ovulated she is scheduled for $PGF_{2\mu}$ administration in 6 days. If no uterine fluid is detected and uterine tone is good the mare may be scheduled to be bred. If there is a question, the mare is treated and or re-examined according to follicle size and presence or absence of uterine fluid. It would be rare for a foal heat service to take precedence over a non foal heat service with a stallion with a busy book (>150 mares per season with natural service).
4. Breeding mares on foal heat with intra-luminal fluid accumulations is avoided. These mares are treated and recycled.
5. Lastly there are two more guidelines that we adhere to. Firstly, we only breed mares on foal heat that are young and reproductively healthy (i.e. <12 YO and with their first, second or third foal) and secondly, mares that have been confined without exercise (i.e. lunging) due to foal problems such as angular limb deformities, are not bred on foal heat regardless.

Diagnosis of endometritis

There are numerous techniques to diagnose endometritis. However, no technique is completely reliable. The common, currently accepted techniques are: 1) rectal palpation, 2) vaginal-speculum examination, 3) bacterial culture of uterine contents, 4) cytological examination of uterine contents, 5) endometrial biopsy and 6) ultrasonography.

A study was conducted (McKinnon et al., 1987a) to examine the efficacy of individual diagnostic techniques to predict endometritis. The experimental model involved sixty intact mares that were treated with progesterone for 31 days, and 50 were inoculated with a broth of *Streptococcus zooepidemicus.* Reproductive evaluations were performed the day progesterone treatment began, 13 days after progesterone treatment began, and two and seven days after various therapeutic regimens. Thus, for the 60 experimental mares, there were 240 individual examinations for endometritis. The following criteria were used to assess degree of endometritis: 1) ultrasonographic detection of intraluminal fluid accumulation, 2) vaginal speculum examination, 3) cytological examination of uterine contents, 4) culture of uterine contents and, 5) acute and chronic inflammatory changes detected by endometrial biopsy. Each individual parameter was assigned a score from 0 to 3. The total index score of 0 to 18 calculated from summation of each component of reproductive evaluation was used as a standard to determine if the mare had endometritis. To determine the efficacy of each individual diagnostic test, a predictive value for each test (for each score >0) was cal-

culated against a positive diagnosis of endometritis obtained from the total index score (at two different levels diagnosis.

Results from this experimental model indicated support for two conclusions: 1) bacterial culture was not as accurate in predicting endometritis as other diagnostic tests, and 2) ultrasonographic detection of any uterine fluid accumulation was an accurate indicator of endometritis(McKinnon et al., 1987a).

This study had several limitations: 1) The model of endometritis was progesterone-dependent and may not accurately reflect the naturally occurring condition of endometritis. A progesterone-dependent model may result in increased bacterial proliferation, decreased neutrophil numbers and function and decreased drainage of uterine contents. 2) Without an independent standard to determine endometritis (i.e. used to compare the individual tests against a positive or negative diagnosis of endometritis), the predictive value in this study may have more accurately reflected each individual component's influence on the total index score.

Despite these drawbacks, the study demonstrated the usefulness of ultrasound to diagnose endometritis. The application of ultrasonography becomes even more apparent when considering that it is non-invasive. All 10 uninoculated control mares developed endometritis most likely induced in progesterone-treated mares from repeated invasion into the uterus to collect data during the study. It can also be concluded that despite accepted hygienic techniques, invasion of the uterus in progesterone-dominated mares resulted in endometritis. Other authors have made similar associations(Hinrichs et al., 1992)K

BREEDING THE PROBLEM MARE

Prebreeding assessment

Ultrasonography is fundamental to any problem mare breeding program(LeBlanc, 2008a; LeBlanc, 2008b; McKinnon and Voss, 1993). The primary goal of the pre-breeding assessment period is to determine if a mare has a uterine environment capable of supporting spermatozoa long enough so they can reach the oviduct in a condition capable of initiating fertilization. It only takes a few hours for spermatozoa to pass through the utero-tubular junction (UTJ) and remain relatively free from toxic products in the uterus. However, fluid inflammatory products, when mixed with spermatozoa, cause an immediate decline in spermatozoal motility that is proportional to the amount of inflammatory products. Also, addition of uterine fluid of grades 1 to 2 to spermatozoa prior to breeding mares by AI resulted in a decreased embryo recovery ($P < 0.05$)(Squires et al., 1989). Addition of an extender to the uterine fluid prior to addition of spermatozoa was reported to arrest the decline in spermatozoal motility "in vitro".(Squires et al., 1989). However it appears that for best fertility, removal of inflammatory products from the uterus prior to introduction of spermatozoa is the most logical approach. To meet these objectives, mares are examined in early estrous. Ultrasonographic identification of uterine fluid and culture and sensitivity results are used to determine whether uterine lavage, ecbolic agents such as oxytocin and/or cloprostenol (Combs et al., 1996; Leblanc et al., 1994; LeBlanc, 1997; McKinnon and Voss, 1993; Pycock, 1994; Pycock and Newcombe, 1996), local antibiotics or a combination of all of the above are necessary to obtain a uterus free from inflammatory products at the time of breeding. It is an inappropriate use of time and finances to breed mares destined to return to estrus, thus mares with abnormal uterine fluid accumulations detected at the time of breeding may have to be recycled as soon as PGF2® is capable of causing luteolysis.

Lavage and retrieval of lactated Ringer's solution from the uterus of mares immediately prior to breeding has been shown not to be detrimental(Vanderwall and Woods, 2003) and should be considered in cases where considerable uterine fluid is detected prior to breeding and recycling the mare is not an option.

Breeding management

If the uterine environment is prepared properly at the time of breeding, then our goal is to prevent contamination at, or immediately after breeding. Clearly, breeding contamination is more easily controlled with AI than with natural service. However, both techniques result in introduction of bacteria. Research in this area was originally reported by Kenney and colleagues in 1975(Kenney et al., 1975). They demonstrated that hygienically collected semen from "non-infected" stallions, contained numerous types of aerobic bacteria and fungi. The total number of aerobic microorganisms in each of eight ejaculations from five stallions collected ranged from 0.09 to 36 million. However, addition of raw semen to non-fat dry milk seminal extenders containing either penicillin-streptomycin (1,500 IU/ml and 1500 g/ml respectively) or gentamicin sulfate (1 mg/ml) resulted in no growth on any of the subcultures from treated samples, including zero time which was after about 5 minutes of exposure. There was heavy growth in all subcultures from raw semen(Kenney et al., 1975). Aerobic bacteria commonly isolated from the urethra, semen and prepuce of stallions are E. coli and other coliforms, Pseudomonas aeruginosa, beta hemolytic and non-hemolytic streptococci (S. zooepidemicus), Klebsiella sp., hemolytic and non-hemolytic staphylococci, Proteus sp., and Corynebacterium. Further experimentation has demonstrated effective elimination of bacteria without affecting motility using seminal extenders containing either penicillin-gentamicin or polymyxin B sulfate (1,000 IU/ml). Thus, it appears that addition of raw semen to appropriate antibiotic-containing seminal extenders is one method of ensuring minimal contamination at the time of breeding(Arriola and Foote, 1982; Blanchard et al., 1987; Danek et al., 1994; Padilla and Foote, 1991; Timoney et al., 1979; Vaillancourt et al., 1993). It is important to remember that some antibiotics affect spermatozoal motility at high concentrations and may adversely affect fertility(Jasko et al., 1993; Pickett et al., 1987). Currently we favour the use of Ticarcillin, Timentin, or Amikacin at 1 mg/ml in extender preparations.

Artificial insemination

If possible, mares are inseminated without disturbing reproductive surgeries such as the Caslick procedure. The perineum is diligently cleaned and dried as previously described and 500 x 106 progressively motile spermatozoa (PMS) mixed with appropriate antibiotic-containing extender are inseminated. Proper technique to ensure cleanliness of the stallion and collection equipment is important. To ensure the antibiotics have had adequate time to eliminate bacterial growth, it is best to allow at least 15 minutes at 370C prior to insemination. If a longer interval is required, extended semen may be cooled to 200C and stored for up to 12 hours(Francl et al., 1987) and often considerably longer at 40C(Douglas-Hamilton et al., 1984). To reduce contaminating organisms to an absolute minimum, a method was devised(Kenney et al., 1975) to "wash" spermatozoa by dilution with an antibiotic-containing extender, followed by centrifugation (300 G) to produce a "soft" pellet, decantation of the supernatant and resuspension of the resulting pellet in fresh, warm extender. This technique has the added advantage of removing much of the seminal plasma which reduces motility after prolonged incubation with minimal damage to spermatozoa(Pickett et al., 1975), however it is time-consuming and may not always be necessary.

Natural service

Mares and stallions to be bred by natural service should be well cleaned. It is wise to avoid strong disinfectants that may cause overgrowth of potentially pathogenic bacteria after prolonged use. A technique of minimizing contamination by prebreeding infusion of 100 to 300 ml of antibiotic-enriched seminal extender has been described. This technique has advantages, however caution should be advised. For maximum reproductive efficiency, 500 x 106 PMS should be deposited into the reproductive tract. However, lower spermatozoal numbers are quite effective in highly fertile stallions. This information was derived from AI with small volumes of semen or semen plus extender. Recent information has indicated that spermatozoal concentration or volume of inseminate may be important factors in fertility. When mares were bred with 250 x 106 PMS in 100 ml of extender, embryo recovery rate was significantly depressed (13.6%, $P < 0.001$) compared to mares bred with these same spermatozoal numbers from the same ejaculates in 10 ml of extender (70.6%)(Squires et al., 1989). This finding becomes important when mares are bred by natural service to stallions that, due to frequent breedings, may have low spermatozoal numbers in normal ejaculate volumes (30 to 150 ml) and thus spermatozoal concentrations lower than the threshold for normal fertility.

Our approach for mares bred by natural service is to use ultrasonographic detection of quality and quantity of fluid combined with culture and sensitivity results to determine optimum treatments. For instance, if mares have a large volume of fluid detected, then voluminous lavage of the uterus with a physiological solution such as Lactated Ringer's Solution (LRS)Dulbecco's phosphate buffered saline that is not expected to be detrimental to spermatozoal survival is instituted immediately prior to breeding. Increased temperature (41-450C) of infused fluids or oxytocin may aid in evacuation of uterine contents. The aim is to clear the uterus of inflammatory products and enable spermatozoa to have a relatively safe passage into the oviduct before further inflammatory products are released. Lavage and retrieval of LRS from the uterus of mares immediately prior to breeding has been shown not to be detrimental(Vanderwall and Woods, 2003).

If small quantities of uterine fluid are detected, then intrauterine antibiotic solutions are infused prebreeding (> 12 hours). If uterine fluid is detected at the time of scheduled breeding, depending on the type and volume of fluid, the mare is either recycled, a small volume of antibiotic containing extender (< 50 ml) is infused immediately prebreeding or oxytocin is administered intravenously and the mare re-examined in 1-2 hours(LeBlanc et al., 1994; Neuwirth et al., 1995). When organizing timing of breeding the problem mare, much effort is directed toward trying to breed only once, just prior to ovulation (< 12 hours). Induction of ovulation with human chorionic gonadotropin (hCG) or deslorelin acetate is routine (see chapter Induction of Ovulation-McKinnon and McCue). Mares are bred regardless of the number of preovulatory follicles and multiple ovulations are actively encouraged. There are few effective, commercially available drugs to increase the number of ovulations per cycle. Recombinant follicle stimulating hormone (eFSH) (see chapter superovulation Squires), although effective, is very expensive for equine use and is no longer commercially available. Immunization against an inhibin subunit has been demonstrated to be effective in increasing ovulation rates in mares(McCue et al., 1992; McKinnon et al., 1992). Conception rates are proportional to ovulation rates(Squires et al., 1987), thus treatment by immunization against inhibin should improve pregnancy rates in normal and subfertile mares and in mares bred to subfertile stallions. With intensive reproductive management, multiple pregnancies when diagnosed early present little difficulty in reduction to a singleton (see chapter on Management of twins -McKinnon).

Postbreeding management

The aim of therapies in the immediate period after breeding is to: a) reduce infection and inflammation to create a uterine environment capable of supporting pregnancy, and b) prevent further contamination. Spermatozoa are safely in the oviduct within 4 hours of breeding and are protected from inflammatory products in the uterus and/or uterine treatments by the utero-tubular junction. The embryo will not be transported from the oviduct through the UTJ until around 5.5 to 6 days after ovulation, however because most intrauterine therapies have an attendant degree of inflammatory response, and to allow time for foreign material to be expelled or absorbed, no treatments are administered after day 4 post- ovulation. The cervix begins to exhibit increasing tone and improves as a barrier to infection within 2 days of ovulation, although it remains more relaxed when inflammation of the reproductive tract is present. In addition, the corpus luteum remains resistant to PGF2® released from local inflammatory responses until at least day 5 after ovulation. Approximately 12-24 hours after breeding, the uterine response to breeding and contamination is assessed by ultrasonography. If fluid is absent, then either no treatments are administered or treatments are administered as indicated daily for 2 additional days. If small amounts of fluid are detected, the same treatment is applied after first lavaging the uterus with LRS. Saline is quite an irritant, especially with low pH(Pascoe et al., 1989). Usually 1-2 L are necessary to remove inflammatory products. When large amounts of fluid are detected, the fluid is recultured and removed by voluminous lavage until returning fluid is free from debris. Oxytocin may be added (20 to 40 IU/L) to flushing solutions and/or administered intravenously. Oxytocin increases myometrial contractions in estrogen dominated reproductive tracts(Jones et al., 1991; Liu et al., 1991) and aids in expulsion of material. Administration of oxytocin causes uterine contractions for 30 to 45 minutes. Alternatively, cloprostenol may be administered to mares that do not evacuate their uterine fluid in response to oxytocin. Uterine contractions following cloprostenol administration last for 2 to 4 hours(LeBlanc, 2008a).

From the preceding discussion it should be clear how fundamental ultrasonography is to good management decisions when breeding mares.

EFFECT OF INTRAUTERINE FLUID ON PREGNANCY RATE AND EARLY EMBRYONIC DEATH

Mares with intrauterine fluid detected prior to ovulation have reduced pregnancy rates. Mares with intrauterine fluid detected after ovulation have reduced pregnancy rates and increased early embryonic death (EED).

A study was designed to determine the influence of intrauterine fluid on pregnancy rate and early embryonic death(McKinnon et al., 1987a). It was concluded from this study that: 1) presence of small quantities of intrauterine fluid during estrus in cycling mares did not affect pregnancy rates at either day 11 or 50; 2) intrauterine fluid, detected 1 or 2 days after ovulation, did not affect day-11 pregnancy rates, but was associated with a significant increase in EED and reduced day-50 pregnancy rates; and 3) presence of intrauterine fluid during diestrus was associated with a significant decrease in day-50 pregnancy rates. Another study revealed the incidence of intrauterine fluid during diestrus (12/43,28%) was associated with the presence of an inflammatory process as indicated by a high biopsy score, reduced progesterone concentrations, and a shorter inter-ovulatory interval(Adams et al., 1987). Mares with intrauterine fluid during diestrus had a lower pregnancy rate at Day 11 and a higher embryonic loss rate by Day 20 than did mares without fluid. The proges-

terone profile and length of inter-ovulatory interval for mares with uterine inflammation suggested that embryonic loss in this herd was due to uterine- induced luteolysis rather than primary luteal inadequacy(Adams et al., 1987).

The effects on pregnancy rate of three different treatments to remove intrauterine fluid were assessed in 1267 mares(Pycock and Newcombe, 1996). The mares were mated and allocated, in strict rotation, to four treatment groups: 1) untreated controls, 2) intrauterine infusion of broad spectrum antibiotics, 3) intravenous injection of oxytocin, 4) intravenous injection of oxytocin followed by intrauterine antibiotics, The pregnancy status of the mares was determined 13 to 15 days and 27 to 30 days after ovulation by ultrasonography, The pregnancy rate of group 4 (72 per cent) was higher than that of group 2 (64 per cent, P<0 . 01) or group 3 (63 per cent, P<0 . 01). The pregnancy rates of groups 2 and 3 were higher than that of group 1 (56 per cent, P<0.01). The treatment with antibiotics and oxytocin appeared to have an additive beneficial effect which suggested two different modes of action of the combination treatment, namely antibacterial activity and fluid drainage. In the untreated mares more fluid accumulated in the uterine lumen after mating, and this was the most likely reason for their lower pregnancy rate(Pycock and Newcombe, 1996).

In our breeding programs the amount and quality of fluid detected with ultrasonography is used to determine how to treat the mare. Large volumes of poor quality (grade 1 or 2) fluid are treated with voluminous saline lavage, whilst small volumes of grade 4 fluid quite often are treated with local antibiotics and oxytocin and/or cloprostenol. When fluid is detected after ovulation then efforts are directed at reducing fluid and inflammation, such as intravenous non steroidal anti-inflammatory agents, intrauterine antibiotics, immune stimulants(Rohrbach et al., 2007) and systemic oxytocin. Cloprostenol is not used after ovulation due to the potential of modification of CL function(Brendemuehl, 2002; Gunthle et al., 2000; Nie et al., 2003a; Nie et al., 2003b).

Uterine Cysts

Prior to ultrasonography, uterine cysts were most commonly diagnosed from post-mortem examination and occasionally by rectal palpation(Kenney and Ganjam, 1975). Subsequently they have been diagnosed by hysteroscopy and ultrasonography(McKinnon et al., 1987c). Cysts in the uterus are fluid-filled and apparently have two origins. Endometrial cysts arise from endometrial glands, and are usually < 10 mm in diameter. The second form of uterine cysts are lymphatic in origin (Fig 3a and b) and generally are larger than endometrial cysts. They are common in older mares(McKinnon et al., 1987c; Stanton et al., 2004; Tannus and Thun, 1995), and have been associated with both normal and abnormal uterine biopsies(Kenney and Ganjam, 1975). Size of uterine cysts may be indicative of origin. Little data has been reported on growth rate of uterine cysts. Despite the occasional large cysts, it is unlikely that they grow at a similar rate as the early embryonic vesicle (days 10 to 20). When visualized with ultrasonography, cysts are commonly rounded, sometimes with irregular borders, and occasionally are multiple or compartmentalized (lymphatic lacunae)(Fig 3c-f). Most cysts are luminal however occasionally transmural and sub-serosal cysts are detected. Movement of the early equine conceptus (days 10 to 16), presence of specular reflection, spherical appearance and growth rate of the embryo should aid in its differentiation from uterine cysts. The relationship between infertility and uterine cysts is axiomatic as cysts increase in number as mares age(Tannus and Thun, 1995). Cysts may impede movement of the early conceptus, restricting the reported ability of the vesicle to prevent luteolysis after day 10(McDowell et al., 1988). Later in pregnancy, contact between the cyst wall and yolk sac or allantois may prevent absorption of nutrients (Fig3f). This may

be more important when considering the recognition that large uterine cysts are more commonly located at the junction of the uterine horn and body(Tannus and Thun, 1995), which is the most common site of vesicle fixation(Ginther, 1983). Finally, cysts are commonly indicative of uterine disease. They may reflect senility or be associated with endometrial fibrosis. It has been reported that there is an association between number of uterine cysts, age of mare(Ginther, 1983), and endometrial biopsy score(Adams et al., 1987). The number of treatments proposed for uterine cysts probably reflects inability of any individual treatment to consistently be useful. Rupture of the fluid-filled structures has been attempted via uterine-biopsy forceps, surgery, fine needle aspiration and puncture via hysteroscopy. Electro-coagulative removal of cysts has also been described. Endometrial curettage and repeated lavage with warm saline (40 to 450C) have also been advocated. Although there are no reports on respective efficiency of these treatments, endometrial curettage and saline lavage are frequently applied to treat the primary problem, which would appear to be lymphatic blockage. It was concluded from one study that: 1) uterine cysts, when detected by ultrasonography, were lymphatic in origin; 2) uterine cysts did not change rapidly in size or shape, although they were more difficult to detect during estrus; 3) treatment with infra-red radiation was not effective; 4) there was no consistent location for uterine cysts; and 5) uterine cysts were commonly associated with chronic, infiltrative, lymphocytic endometritis(McKinnon et al., 1987a)

Another study on 259 normal fertile Thoroughbred mares(Tannus and Thun, 1995) revealed the incidence of uterine cysts was 22.4%. Of the 95 cysts observed during the trial, 87.4% were located in the middle and posterior segments of both uterine horns. The size of all cysts ranged between 3 and 48 mm. When all mares were assigned to three age groups, A < 7 years (n = 116), B 7-14 years (n = 117) and C > 14 years (n = 26), a significant ($P < 0.01$) increase in the number of cysts was observed with advancing age (4.3%, 29.1% and 73.1%, respectively). The seasonal pregnancy rates at Days 14 and 40 were significantly ($P < 0.01$) lower in mares with cysts (77.6% and 71.4%) compared to mares without cysts (91.5% and 88.0%). This suggested to the authors that the presence of uterine cysts plays an important role in the reduction of fertility of Thoroughbred mares(Tannus and Thun, 1995).

From our experience cysts are more commonly noted in older mares and are also more commonly recognized in the immediate postpartum period and at the corpus cornual junction. Uterine cysts are more commonly pedunculated and luminal, however, transmural and non pedunculated cysts are also seen. Our preferred treatment for uterine cysts when we believe treatment is necessary, has been to dilate the mares cervix whilst in heat and ablating the cyst manually. This performed by placing the cyst in between two fingers and tearing or crushing the cyst of the uterine wall. Non-pedunculated cysts may be more difficult to destroy this way, however they seldom appear to cause many problems. Recently, a simple improvised snare technique has been described to remove pedunculated uterine cysts(DeLuca et al., 2009). The snare consists of two insemination pipettes fixed together with a long portion of thick suture material as the snare. The suture material is passed over the cyst and fixed at the pedunculated base of the cyst. A sawing motion is used to transect the stalk (fig 3g and h).

See pictures on page 113 - 114 - 115

INTRAUTERINE AIR

Air is recognized by the presence of multiple, hyper-echogenic reflections (Fig 4a and b) (occasionally a ventral reverberation artifact is present and it appears to be more prevalent slightly cranial to the cervix, although it can be present in the cranial body or uterine horns. When air is present < 24 hr after artificial insemination, we consider it normal. However, we do not expect it to be detected in normal mares > 24 hr after breeding. The observation of air in the uterus of mares that have not been cultured or bred recently is an indication of pneumo-uterus and reflects failure of the competency of the vaginal labia, vestibulo-vaginal sphincter and(or) cervix(McKinnon et al., 1987a). In our experience it has been of use to determine when some mares may need to be caslicked, particularly so when a clinical examination did not suggest the procedure. Occasionally air may be detected in a pregnant mare. In these cases the prognosis for pregnancy maintenance is poor.

See pictures on page 116

FOREIGN BODIES

On occasion, strongly echogenic areas in the uterine lumen are observed with a concomitant echo shadow, such as is seen with dense tissue like fetal bone (Fig 5a). This might be expected after mummification. We have also identified a similar ultrasonographic image that was confirmed subsequently as the tip of a uterine culturette (Fig 5b). Another substance that creates a strong echo shadow is the presence of chronically retained fetal membrane. These cases are usually first recognized at the first post partum examination, however they may not be apparent until the echogenicity increases. In addition we have seen a few interesting cases such as calcification on the uterine epithelial surface, suture material after a cesarean section and post treatment debris after multiple antibiotic suspension treatments into the uterus of a mare that had poor uterine clearance abilities. Marbles placed into the uterus to create a pseudo-pregnant state are easily visualized by ultrasonography (Fig 5 c and d)

See pictures on page 117 - 118

RETAINED ENDOMETRIAL CUPS

In a normal pregnancy the endometrial cups are not detected, however on occasion after EED and expulsion of fetal fluids they may become visible. Mares can in unusual circumstances retain endometrial cups(Silva et al., 1995; Willis and Riddle, 2005) in an active state for a long time (a year or more) despite either foaling, aborting or suffering from early embryonic death(Steiner et al., 2006). These mares present as dry mares in the next breeding season and typically have irregular estrus cycles with abnormal ovarian function such as follicles that luteinize without ovulating. Presumably the abnormal ovarian function is associated with the high levels of equine chorionic gonadotrophin (eCG) that are secreted from the retained cups. Mares with retained cups may exhibit irregular or prolonged estrus or anestrus behaviour. A diagnosis of retained endometrial cups can be suggested by ultrasonography and confirmed by endoscopy of the uterus or by measurement of serum eCG concentrations (Fig 6). Retained endometrial cups will eventually be removed by im-

munological rejection but it may take months. There is no technique currently available to consistently hasten the removal of aberrant persistent endometrial cups(Steiner et al., 2006).

See pictures on page 119

UTERINE ADHESIONS

Occasionally after severe trauma to the reproductive tract or even after irritation from endometritis, transluminal uterine adhesions will form. Because of continuing secretions from the oviduct or endometritis in the horn proximal to the adhesions, fluid will accumulate in the tip of the affected horn. This fluid is well localized and should make the examiner suspicious of a complete adhesion. Diagnosis can be confirmed manually after first gently dilating the cervix or if that is not possible, infusions of fluid (i.e. 1 L of LRS) into the uterus should demonstrate lack of fluid entering part of the uterus (typically a uterine horn). When adhesions exist it is not possible to dilate the tip of the affected horn because the fluid has restricted or denied entry. Adhesions may respond to manual breakdown and multiple infusions of an antibiotic extender, however some appear to get worse with the irritation of treatment and may respond better to either an oily based corticosteroid cream or rest from treatment for at least three weeks. a Less commonly recognized uterine pathology

Uterine neoplasia, abscesses and hematomas can be recognized with ultrasonography. Lieomyomas of the uterus are not uncommon although careful scrutiny may be necessary to detect them as their detectable size varies from 10mm up to as large as 60mm. Lieomyomas are only slightly more echogenic than the uterus and they present as rounded discrete masses (Fig7a-c).

Ultrasonography may be useful in recognition of mucus layers and biofilm in the mares' uterus (Fig 2g-i). Biofilm production is a protective mechanism of certain bacteria and is associated with increased difficulty to eliminate the infection with traditional treatment. Recent therapies showing promise for mucus and biofilm removal or modification are N-acetylcysteine (NAC) (30 ml of a 20% solution in 150 ml of saline)(Gores-Lindholm et al., 2009) or Ethylene-diaminetetraacetic acid-tromethamine (EDTA-tris) (250 ml of 3.5 mM EDTA, 0.05 M tris, pH 8 –(LeBlanc, 2008a).

See pictures on page 120

EVALUATION OF THE CAUDAL REPRODUCTIVE TRACT

Ultrasonography has not been particularly useful for diagnosis of cervical conditions, however on a few occasions we have identified pathology such as cysts or scarring of the cervix. In general, manual or speculum examination are more useful. Once the reproductive tract is fully involuted and the mare is in diestrus (when the cervix should be completely closed), the cervix can be evaluated to determine whether it is capable of closing. Involution is also necessary to allow identification of the muscular and mucosal layers that must be debrided and sutured. We commonly find unidentified cervical tears when referred cases of problem mares. In addition it is surprising how many mares with cervical defects will become pregnant.

Ultrasonography can be useful in diagnosing cases of vaginal hematomas and abscesses (see above). Careful evaluation may even reveal urine or other fluid in the vagina/vestibule in mares with reproductive problems (Fig 8).

See pictures on page 121

REFERENCES

1. Adams, G. P., J. P. Kastelic, D. R. Bergfelt, and O. J. Ginther. 1987. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. J Reprod Fertil. Suppl 35:445-454.
2. Arriola, J. and R. H. Foote. 1982. Effects of amikacin sulfate on the motility of stallion and bull spermatozoa at different temperatures and intervals of storage. J. Anim. Sci. 54:1105-1110.
3. Blanchard, T. L., D. D. Varner, S. P. Brinsko, S. A. Meyers, and L. Johnson. 1989. Effects of postparturient uterine lavage on uterine involution in the mare. Theriogenology 32:527-535.
4. Blanchard, T. L., D. D. Varner, C. C. Love, J. P. Hurtgen, M. R. Cummings, and R. M. Kenney. 1987. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to Pseudomonas aeruginosa. Theriogenology 28:541-546.
5. Brendemuehl, J. P. Effect of oxytocin and cloprostenol on luteal formation, function and pregnancy rates in mares. Theriogenology 58[2-4], 623-626. 2002.
6. Ref Type: Journal (Full)
7. Causey, R. C. 2006. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. Vet J 172:405-421.
8. Combs, C. B., M. M. LeBlanc, L. Neuwirth, and T. W. Tran. 1996. Effects of Prostaglandin-F2--Alpha Cloprostenol and Fenprostalene on Uterine Clearance of Radiocolloid in the Mare (Vol 45, Pg 1449, 1996). Theriogenology 46:U3.
9. Danek, J., E. Wisniewski, W. Krumrych, and J. Dabrowska. 1994. Prevalence and Sensitivity to Antibiotics of Facultative Pathogenic Bacteria Isolated from the Semen of Stallions. Med. Weter. 50:385-387.
10. DeLuca, C. A., E. K. Gee, and P. M. McCue. 2009. How to remove to remove large endometrial cysts with an improvised snare: A simple technique for practitioners. Proc AAEP 55:328-330.
11. Douglas-Hamilton, D. H., R. Osol, G. Osol, D. Driscoll, and H. Noble. 1984. A field study of the fertility of transported equine semen. Theriogenology 22:291-304.
12. Evans, M. J., J. M. Hamer, L. M. Gason, C. S. Graham, A. C. Asbury, and C. H. G. Irvine. 1986. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra- uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. Theriogenology 26:37-50.
13. Francl, A. T., R. P. Amann, E. L. Squires, and B. W. Pickett. 1987. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20 degrees C. Theriogenology 27:517-525.
14. Ginther, O. J. 1983. Fixation and orientation of the early equine conceptus. Theriogenology 19:613-623.
15. Ginther, O. J., M. C. Garcia, D. R. Bergfelt, G. S. Leith, and S. T. Scraba. 1985. Embryonic loss in mares: Pregnancy rate, length of interovulatory intervals, and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. Theriogenology 24:409-418.
16. Glatzel, P. S. and J. P. Belz. 1995. Fertility in Mares After Disturbed or Undisturbed Puerperal Periods - Significance of Clinical, Microbiological and Hormonal Examinations. Berl. Mun. Tierarztl. Wochenschr. 108:367-372.
17. Gores-Lindholm, A., R. Causey, M. Calderwood-Mays, and M. M. LeBlanc. 2009. Effect of intra-uterine infusion of diluted N-Acetylcysteine on equine endometrium. Proc AAEP 55:326.

18. Griffin, P. G., E. M. Carnevale, and O. J. Ginther. 1993. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. Animal Reproduction Science 31:311-329.
19. Griggers, S., D. L. Paccamonti, R. A. Thompson, and B. E. Eilts. 2001. The effects of ph, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. Theriogenology 56:613-622.
20. Gunthle, L. E., P. M. McCue, V. J. Farquhar, and R. A. Foglia. 2000. Effect of prostaglandin administration postovulation on corpus luteum development in the mare. Proc Soc Therio139.
21. Hayes, K. E. N., R. A. Pierson, S. T. Scraba, and O. J. Ginther. 1985. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. Theriogenology 24:465-477.
22. Hinrichs, K., M. S. Spensley, and P. L. McDonough. 1992. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. Equine Veterinary Journal 24:457-461.
23. Ishii, M., T. Shimamura, A. Utsumi, T. Jitsukawa, M. Endo, T. Fukuda, and T. Yamanoi. Reproductive performance and factors that decrease pregnancy rate in heavy draft horses bred at the foal heat. J Equine Vet Sci 21[3], 131-136. 2001.
24. Ref Type: Journal (Full)
25. Jasko, D. J., S. J. Bedford, N. L. Cook, E. L. Mumford, E. L. Squires, and B. W. Pickett. 1993. Effect of Antibiotics on Motion Characteristics of Cooled Stallion Spermatozoa. Theriogenology 40:885-893.
26. Jones, D. M., E. D. Fielden, and D. H. Carr. 1991. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 44:357-368.
27. Kenney, R. M., R. V. Bergman, W. L. Cooper, and G. W. Morse. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares:Technique and preliminary findings. Proc. AAEP327-335.
28. Kenney, R. M. and V. K. Ganjam. 1975. Selected pathological changes of the mare uterus and ovary. J. Reprod. Fertil. Suppl 23:335-339.
29. Knutti, B., J. F. Pycock, G. C. Vanderweijden, and U. Kupfer. The influence of early postbreeding uterine lavage oil pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. Equine Vet Educ 12[5], 267-270. 2000.
30. Ref Type: Journal (Full)
31. Leblanc, M., L. Neuwirth, D. Mauragis, E. Klapstein, and T. Tran. 1994. Oxytocin Enhances Clearance of Radiocolloid from the Uterine Lumen of Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis. Equine. Vet. J. 26:279-282.
32. LeBlanc, M. M. 1997. Effects of Oxytocin, Prostaglandin and Phenylbutazone on Uterine Clearance of Radiocolloid. Pferdeheilkunde. 13:483-485.
33. LeBlanc, M. M. 2008a. The chronically infertile mare. Proc AAEP 54:391-407.
34. LeBlanc, M. M. 2008b. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. Theriogenology 70:421-429.
35. LeBlanc, M. M., L. Neuwirth, A. C. Asbury, T. Tran, D. Mauragis, and E. Klapstein. 1994. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. Equine Vet J 26:109-113.
36. Lieux, P. 1980. Comparative results of breeding on first and second post-foaling heat periods. Proc. AAEP129-132.
37. Liu, I. K. M., M. H. T. Troedsson, D. C. Williams, and J. R. Pascoe. 1991. Electromyography of uterine activity in the mare: comparison of single vs multiple recording sites. J. Reprod. Fertil. Suppl. 44:744.
38. Lowis, T. C. and J. H. Hyland. 1991. Analysis of post-partum fertility in mares on a thoroughbred stud in southern Victoria. Aust Vet J 68:304-306.
39. Loy, R. G., M. J. Evans, R. Pemstein, and T. B. Taylor. 1982. Effects of injected ovarian steroids on reproductive patterns and performance in post-partum mares. J. Reprod. Fertil. Suppl. 32:199-204.
40. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. Theriogenology 58[2-4], 495-498. 2002.

41. Ref Type: Journal (Full)
42. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. Pferdeheilkunde 19[6], 646-649. 2003a.
43. Ref Type: Journal (Full)
44. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season. Pferdeheilkunde 19[6], 641-645. 2003b.
45. Ref Type: Journal (Full)
46. McCue, P. M., N. J. Carney, J. P. Hughes, J. Rivier, W. Vale, and B. L. Lasley. 1992. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. Theriogenology 38:823-831.
47. McCue, P. M. and J. P. Hughes. 1990. The effect of postpartum uterine lavage on foal heat pregnancy rate. Theriogenology 33:1121-1129.
48. McDowell, K. J., D. C. Sharp, W. Grubaugh, W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1988. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. Biology Of Reproduction 39:340-348.
49. McKinnon, A. O., R. W. Brown, R. L. Pashen, P. E. Greenwood, and J. R. Vasey. 1992. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha--subunit. Equine. Vet. J. 24:144-146.
50. McKinnon, A. O., E. L. Squires, E. M. Carnevale, L. A. Harrison, D. D. Frantz, A. E. McChesney, and R. K. Shideler. 1987a. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. Proc. AAEP605-622.
51. McKinnon, A. O., E. L. Squires, L. A. Harrison, E. L. Blach, and R. K. Shideler. 1988. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. Journal Of The American Veterinary Medical Association 192:350-353.
52. McKinnon, A. O., E. L. Squires, and J. L. Voss. 1987b. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract: Part I. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9:336-345.
53. McKinnon, A. O., E. L. Squires, and J. L. Voss. 1987c. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract: Part II. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9:472-482.
54. McKinnon, A. O. and J. L. Voss. 1993. Breeding the problem mare. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 368-378. Lea & Febiger, Philadelphia, London.
55. Merkt, H. and A. R. Gunzel. 1979. A survey of early pregnancy losses in West German thoroughbred mares. Equine. Vet. J. 11:256-258.
56. Neuwirth, L., M. M. LeBlanc, D. Mauragis, E. Klapstein, and T. Tran. 1995. Scintigraphic Measurement of Uterine Clearance in Mares. Vet. Radiol. Ultrasound. 36:64-68.
57. Nie, G. J., K. E. Johnson, J. G. Wenzel, and T. D. Braden. 2003a. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. Theriogenology 60:1111-1118.
58. Nie, G. J., K. E. Johnson, J. G. Wenzel, and T. D. Braden. 2003b. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on day 0, 1 or 2 post-ovulation. Theriogenology 60:1119-1125.
59. Nikolakopoulos, E. and E. D. Watson. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. Theriogenology 52:413-423.
60. Ozgen, S., H. A. Schoon, H. Aupperle, H. Sieme, and E. Klug. Etiopathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. Pferdeheilkunde 18[6], 594-599. 2002.
61. Ref Type: Journal (Full)
62. Padilla, A. W. and R. H. Foote. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. J Anim Sci 69:3308-3313.
63. Pascoe, D. R., G. H. Stabenfeldt, J. P. Hughes, and H. Kindahl. 1989. Endogenous prostaglandin F-2alpha release induced by physiologic saline solution infusion in utero in the mare: Effect of temperature, osmolarity, and pH. American Journal Of Veterinary Research 50:1080-1083.

64. Pickett, B. W., E. L. Squires, and A. O. McKinnon. 1987. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artifical insemination. Animal Reproduction Labrotary, Colorado State University.

65. Pickett, B. W., J. J. Sullivan, W. W. Byers, M. M. Pace, and E. E. Remmenga. 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil. Steril. 26:167-174.

66. Platt, H. 1973. Aetiological aspects of abortion in the Thoroughbred mare. J. Comp. Pathol. 83:199-205.

67. Pope, A. M., D. L. Campbell, and J. P. Davidson. 1979. Endometrial histology and post-partum mares treated with progesterone and synthetic GnRH (AY-24,031). J Reprod Fertil. Suppl587-591.

68. Pycock, J. F. 1994. Assessment of Oxytocin and Intrauterine Antibiotics on Intrauterine Fluid and Pregnancy Rates in the Mare. Proc. AAEP 40:19-20.

69. Pycock, J. F. and J. R. Newcombe. 1996. Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. Vet Rec 138:320-323.

70. Rohrbach, B. W., P. C. Sheerin, C. K. Cantrell, P. M. Matthews, J. V. Steiner, and L. E. Dodds. 2007. Effect of adjunctive treatment with intravenously administered Propionibacterium acnes on reproductive performance in mares with persistent endometritis. J Am Vet Med Assoc 231:107-113.

71. Samper, J. C. 1997. Ultrasonograhic appearance and the pattern of uterine edema to time of ovulation in the mare. Proc AAEP 43:191.

72. Schilela, A., E. Malschitzky, A. L. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Effect of an intra-uterine fluid accumulation before and after the first postpartum ovulation on pregnancy rates in the mare. Pferdeheilkunde 17[6], 639-643. 2001.

73. Ref Type: Journal (Full)

74. Sexton, P. E. and F. M. Bristol. 1985. Uterine involution in mares treated with progesterone and estradiol-17beta. J. Am. Vet. Med. Assoc. 186:252-256.

75. Silva, M. I., E. F. Nascimento, and G. D. Cassali. 1995. Persistent Endometrial Cups in Mare - Case-Report. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 47:31-36.

76. Squires, E. L., C. K. Barnes, H. S. Rowley, A. O. McKinnon, B. W. Pickett, and R. K. Shideler. 1989. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. Proc. AAEP25-30.

77. Squires, E. L., C. P. Heesemann, S. K. Webel, R. K. Shideler, and J. L. Voss. 1983. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. J. Anim. Sci. 56:901-910.

78. Squires, E. L., A. O. McKinnon, E. M. Carnevale, R. Morris, and T. M. Nett. 1987. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. J Reprod Fertil. Suppl 35:399-403.

79. Stanton, M. B., J. V. Steiner, and D. G. Pugh. Endometrial cysts in the mare. J Equine Vet Sci 24[1], 14-19. 2004.

80. Ref Type: Journal (Full)

81. Steiner, J., D. F. Antczak, K. Wolfsdorf, K. Saville, S. Brooks, D. Miller, E. Bailey, and W. Zent. Persistent endometrial cups. Anim.Reprod.Sci. 94, 274-275. 2006.

82. Ref Type: Journal (Full)

83. Sullivan, J. J., P. C. Turner, L. C. Self, H. B. Gutteridge, and D. E. Bartlett. 1975. Survey of reproductive efficiency in the Quarter-horse and Thoroughbred. J Reprod Fertil. Suppl315-318.

84. Tannus, R. J. and R. Thun. 1995. Influence of Endometrial Cysts on Conception Rate of Mares. J. Vet. Med. A-Zbl. Vet. A-Physiol. 42:275-283.

85. Timoney, P. J., P. J. O'Reilly, A. M. Harrington, R. McCormack, and J. F. McArdle. 1979. Survival of Haemophilus equigenitalis in different antibiotic- containing semen extenders. J. Reprod. Fertil. Suppl.377-381.

86. Troedsson, M. T. 1997. Therapeutic Considerations for Mating-Induced Endometritis. Pferdeheilkunde. 13:516-520.

87. Vaillancourt, D., P. Guay, and R. Higgins. 1993. The effectiveness of gentamicin or polymyxin B for the control of bacterial growth in equine semen stored at 20 degrees C or 5 degrees C for up to forty-eight hours. Canadian Journal Of Veterinary Research 57:277-280.

88. Vanderwall, D. K. and G. L. Woods. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. J Amer Vet Med Assn 222[8], 1108-1110. 2003.

89. Ref Type: Journal (Full)

90. Watson, E. D., S. Barbacini, B. Berrocal, O. Sheerin, V. Marchi, G. Zavaglia, and D. Necchi. 2001. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. Theriogenology 56:123-131.

91. Willis, L. A. and W. T. Riddle. Theriogenology question of the month. J Am Vet Med Assoc 226[6], 877-879. 2005.

92. Ref Type: Journal (Full)

93. Winter, A. J. 1982. Microbial immunity in the reproductive tract. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181:1069-1073.

94. Woods, G. L., C. B. Baker, J. L. Baldwin, B. A. Ball, J. Bilinski, W. L. Cooper, W. B. Ley, E. C. Mank, and H. N. Erb. 1987. Early pregnancy loss in brood mares. J Reprod Fertil. Suppl 35:455-459.

Anormalidades uterinas

AO McKinnon[1]*, BVSc, MSc, Dip LAM, Dip ABVP, Dip ACT; and PM McCue*[2]*, DVM, PhD, Dip ACT*

[1]*Goulburn Valley Equine Hospital, Conjupna, Victoria 3632, Australia;* [2] *Animal Reproduction an Biotechnology, Colorado State University, Fort Collins, Co, USA*

Mediante la ultrasonografía, el útero puede ser examinado de manera no invasiva para evaluar la anatomía reproductiva normal, detectar cambios patológicos y monitorear regímenes terapéuticos. Las patologías uterinas más comunes en la yegua vacía son acumulación de fluido intrauterino, cambios inflamatorios, quistes uterinos y neumoutero. Menos frecuentemente, cuerpos extraños, remanentes fetales, detritus, abscesos, copas endometriales persistentes y neoplasias. La aplicación de la ultrasonografía en las yeguas peri parto ha demostrado su utilidad al examinar yeguas con problemas tales como placentitis y hemorragia post parto. Cada año vemos yeguas preñadas que se presentan para exámenes reproductivos o para servicio que han sido mal diagnosticadas como no preñadas la temporada anterior. Las razones de esta situación son variadas pero esto ocurre comúnmente cuando se realiza un único diagnostico gestacional a los 13 o 15 días y la yegua no es revisada nuevamente. La evaluación ecográfica del útero identificará la preñez y ayudará a prevenir una evaluación inapropiada y aborto iatrogénico.

INFLAMACIÓN UTERINA

Las cambios inflamatorios en el útero de la yegua son reconocidos por la presencia de fluido uterino (ver debajo) y/o un marcado incremento del edema endometrial (pliegues endometriales). Durante el ciclo estral normal el edema es detectado normalmente y sigue el patrón de producción de estrógenos, por ende al igual que el estrógeno, el edema uterino hace un pico aproximadamente a las 24 hs previas a la ovulación (Hayes et al., 1985; McKinnon et al., 1987b). El edema endometrial normal del ciclo estral se gradúa en una escala del 1 al 3 (McKinnon et al., 1987b). El edema es mínimo o se encuentra ausente cerca de la ovulación y cuando se realizan exámenes periódicos se puede prevenir el momento de la ovulación al observar la disminución del edema desde el grado 3 al 0 (McKinnon et al., 1987b; Samper, 1997). Cuando se detecta edema en yeguas en diestro o preñadas, o cuando es muy marcado (mayor a 3) es un signo de inflamación (Fig. 1 a-d). Cierto grado de edema uterino en la superficie dorsal del útero en yeguas preñadas entre los días 17 y 30 es normal y se encuentra asociado a un aumento en el tono, fijación y producción local de estrógenos por el embrión (Griffin et al., 1993). Un edema marcado (grado 4) puede enmascarar la presencia de pequeñas cantidades de fluido intrauterino. En ocasiones, la administración sistémica de 20-30 mg de dexametasona fosfato puede resultar en una reducción espectacular del edema desde el grado 4 al 1, o incluso no detectable en el lapso de 1 hora.

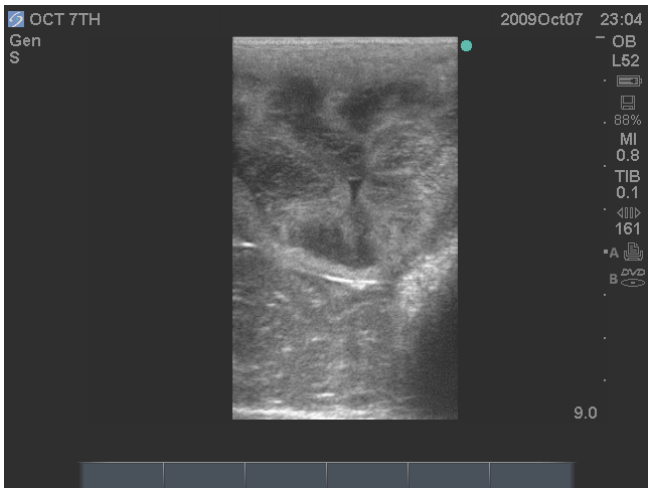


Fig. 1a Edema grado 4 (pliegues endometriales) del cuerno uterino con una pequeña cantidad de fluido grado 4.

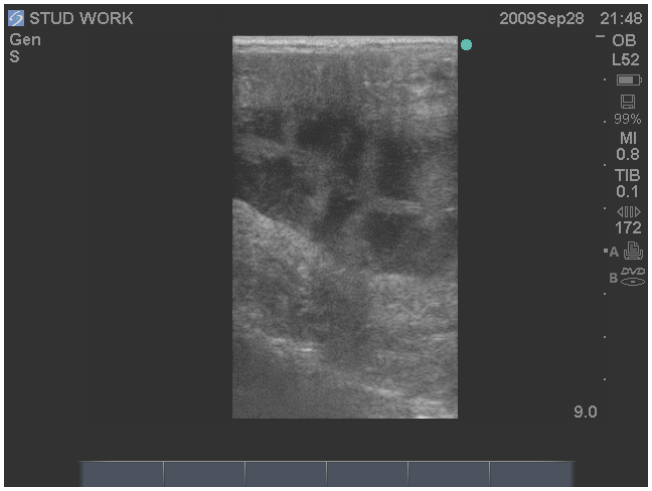


Fig. 1b Edema grado 4 en el cuerpo del útero.

Fig. 1c El edema uterino puede ser normal en yeguas preñadas entre la fijación y el día 30 y se observa usualmente a dorsal. Luego de este tiempo la rápida expansión de los compartimientos líquidos de la preñez se asocian con un adelgazamiento progresivo del útero y pérdida de pliegues.

Fig. 1d El edema en este útero es más pronunciado que lo normal e involucra a las superficies dorsal y ventral. Probablemente se trate de una anormalidad.

FLUIDO UTERINO

La ecografía es extremadamente valiosa para estimar la calidad y cantidad de fluido en el lumen uterino. La palpación transrectal del útero con fluido sólo es precisa cuando la cantidad de fluido es grande (◎100 ml) y/o cuando hay cambios en la tonicidad uterina. La confirmación de la presencia de pequeños volúmenes de fluido intrauterino, sin realizar técnicas invasivas como lavajes y citologías, fue difícil hasta que se hizo posible la visualización no invasiva a través de la ultrasonografía. Los volúmenes de fluido intraluminal se estiman mediante ecografía (graduado como: muy pequeño, pequeño, medio, grande, excesivo) y la calidad se gradúa del 1 al 4 de acuerdo al grado de ecogenicidad (McKinnon et al., 1988) (Fig. 2 a-d). El grado de ecogenicidad está relacionado a la cantidad de detritus o glóbulos blancos en el fluido. El fluido de grado 1 tiene una gran cantidad de neutrófilos y el de grado 4 tiene muy pocos cuando la ecogenicidad está relacionada a inflamación. Otros tipos de fluido que pueden detectarse en el lumen uterino son orina, sangre, mucus, biofilms y transudados asociados a edema uterino (Fig. 2 e-l).

La piómetra es una acumulación de material purulento en el lumen uterino y es identificada a la ecografía como un útero altamente agrandado, lleno de fluido ecogénico con la pared uterina afinada (Fig. 2 m). El grado de afinamiento de las paredes uterinas puede verse enmascarado en caso de que haya una excesiva cantidad de fluido y distensión uterina, pero puede apreciarse cuando se vacía el útero. Las grandes acumulaciones de fluido pueden estar asociadas a obstrucciones físicas o defectos funcionales en el cérvix. Puede observarse una descarga vaginal intermitente si el cérvix tiene capacidad de abrirse. Las yeguas usualmente no están afectadas sistémicamente y están ausentes signos clínicos tales como septicemia, depresión y anorexia. Los cambios hematológicos, cuando están presentes, son mínimos. El daño endometrial debido a la inflamación crónica puede resultar en una falla en la secreción de prostaglandinas y persistencia del cuerpo lúteo. El diagnostico se basa en la palpación, ultrasonografía transrectal del tracto reproductivo y examen mediante especulo, cultivo y citología si el cérvix es funcional. El pronóstico para la fertilidad futura es reservado y en la mayoría de los casos el tratamiento está destinado preservar a la yegua para propósitos no reproductivos. La orina en el útero puede resultar de un reflujo vesico-vaginal y el subsecuente drenaje hacia craneal a través del cérvix abierto; también puede ocurrir por la contaminación de un padrillo con urospermia. La urospermia resulta en una declinación inmediata en la motilidad espermática (Griggers et al., 2001) y por lo

tanto tiene un impacto negativo sobre la fertilidad. Además, la orina en el útero (Fig. 2e) crea una endometritis química y si persiste puede interferir con el mantenimiento de la preñez. La orina en el útero de la yegua es identificada como acumulaciones hiperecoicas ubicadas comúnmente en la unión del cuerpo con el cuerno, que no se mezclan fácilmente cuando se las golpea con el transductor. Se cree que la ecogenicidad de la orina se debe a una combinación de cristales y mucus. La orina en el útero debe ser removida con un lavaje voluminoso. La observación de la calidad y cantidad del fluido ha sido utilizada para evaluar la eficacia de varios procedimientos terapéuticos en yeguas tratadas por endometritis de origen natural (Causey, 2006; McKinnon y Voss, 1993; Pycock, 1994; Pycock y Newcombe, 1996). Algunos experimentos (Adams et al., 1987; Ginther et al., 1985; Knutti et al., 2000; Malschitzky et al., 2002; Malschitzky et al., 2003a; Malschitzky et al., 2003b; McKinnon et al., 1987a; McKinnon et al., 1988; Nikolakopoulos and Watson, 1999; Ozgen et al., 2002; Pycock, 1994; Pycock and Newcombe, 1996; Schilela et al., 2001; Troedsson, 1997; Watson et al., 2001) han sido destinados a determinar la relación del fluido endometrial con la fertilidad.

Ciertas áreas en las cuales el reconocimiento de fluido intrauterino puede ser de particular valor son 1) evaluación de la yegua post parto, 2) diagnostico y tratamiento de la endometritis inducida por el servicio, 3) diagnostico y tratamiento de endometritis infecciosa, 4) efectos sobre la tasa de preñez y muerte embrionaria temprana (MET).

La ultrasonografía también puede ser una herramienta valiosa en el caso de lavajes uterinos cuando se dificulta la recuperación de fluido (Fig. 2n). La mayoría de los casos involucra a yeguas viejas en las cuales la porción más pendular del útero se encuentra cráneo ventral al borde de la pelvis. Debe reconocerse la ubicación del fluido, desinflarse el balón de la sonda de lavaje y hacer avanzar la misma hasta alcanzar el fluido. En ciertos casos puede ser necesario realizar una infusión de 500 ml de solución de lavaje (ej.: solución de Ringer lactato) para distender el útero previo al avance de la sonda.

Fig. 2a Fluido uterino grado 1.

Fig. 2b Fluido uterino grado 2.

Fig. 2c Fluido uterino grado 3.

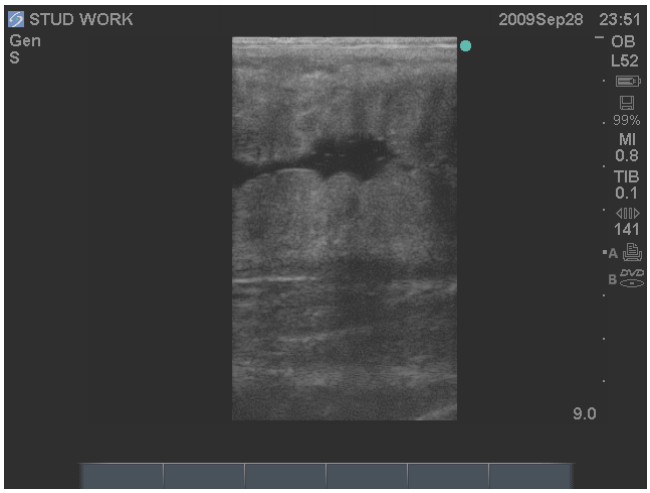


Fig. 2d Fluido uterino grado 4.

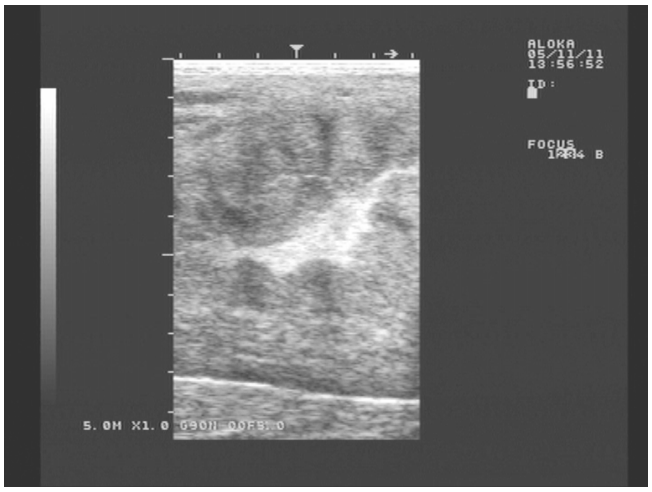


Fig. 2e Presencia de orina en el útero.

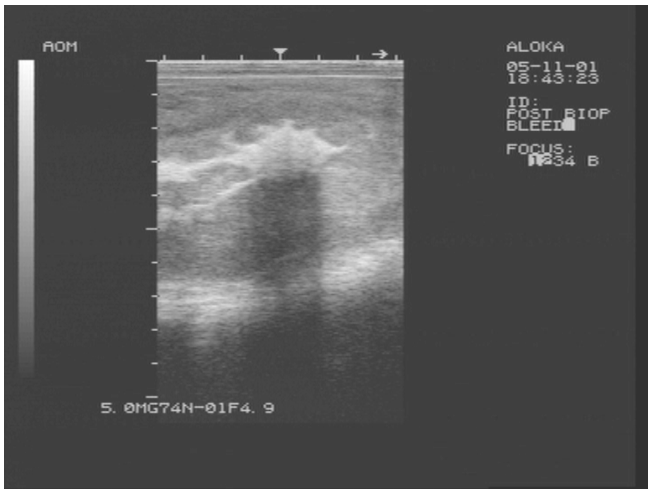


Fig. 2f Presencia de sangre en el útero luego de una biopsia endometrial.

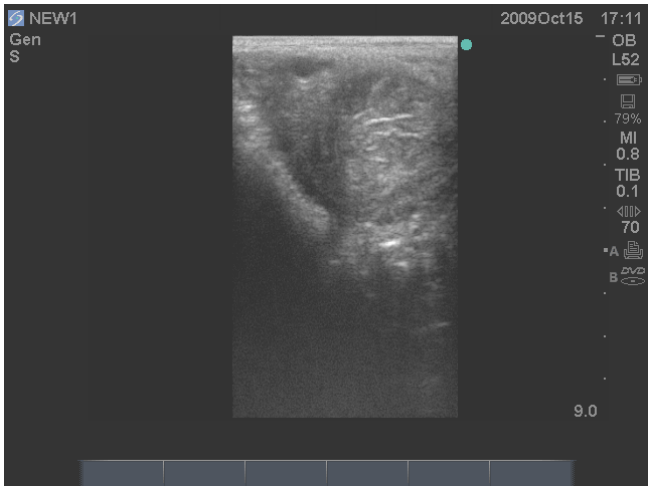


Fig. 2g Capa de Biofilm en el cuerno uterino.

Fig. 2h Capa de Biofilm en el cuerpo uterino.

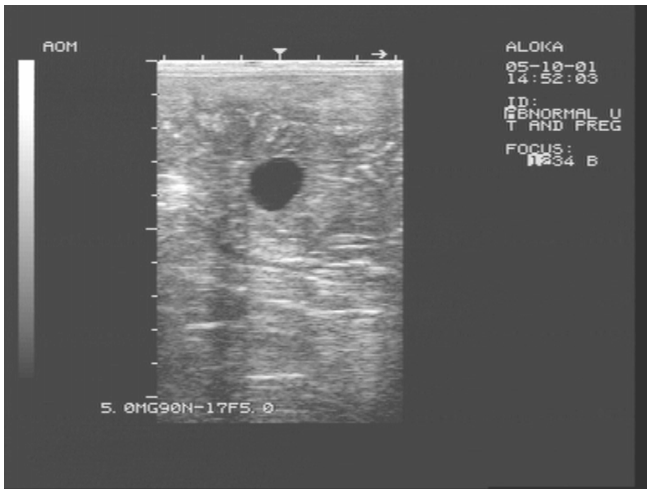


Fig. 2i Capa de Biofilm en un útero gestante.

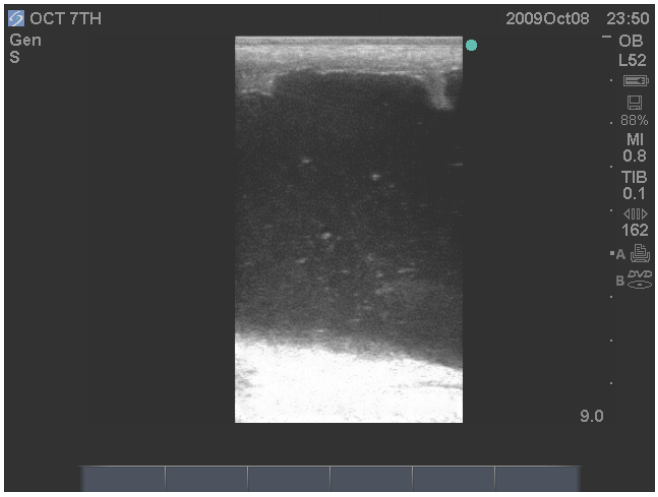


Fig. 2j Mucus con neutrófilos muy pequeños segmentados en alto poder.

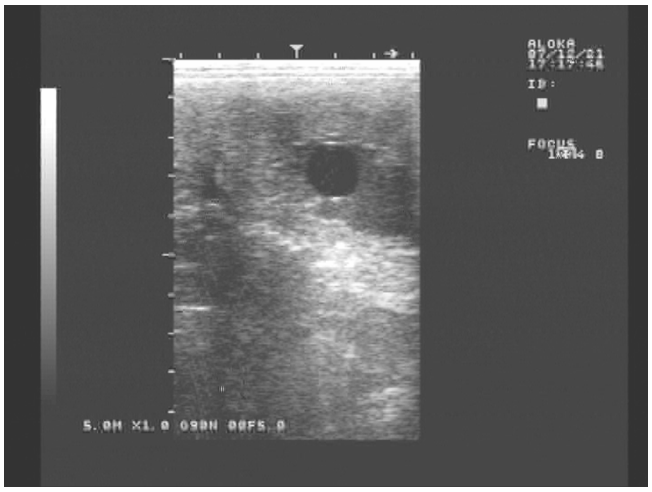


Fig. 2k Preñez rodeada de fluido grado 2.

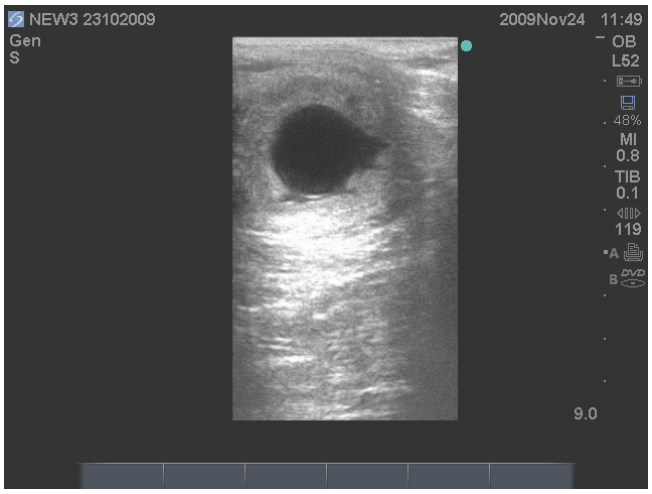


Fig. 2l Preñez rodeada de una pequeña cantidad de fluido grado 4.

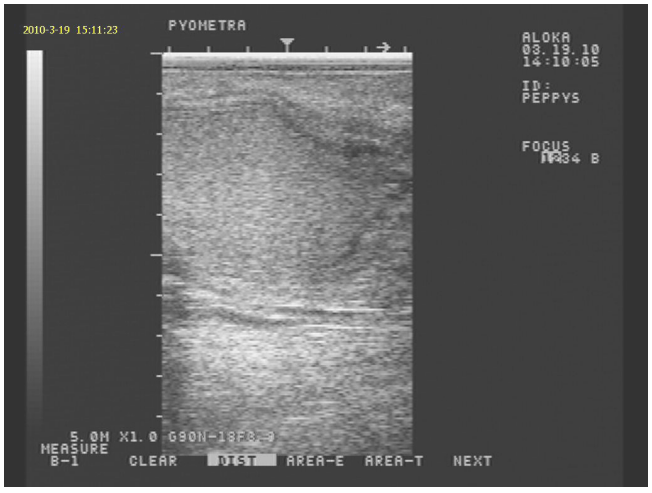


Fig. 2m La piómetra puede ser detectada por ultrasonografía como un útero muy agrandado lleno de fluido ecogénico y con las paredes finas.

Fig. 2n Obsérvese la punta de la sonda visible en un útero con fluido.

ESTUDIOS ULTRASONOGRÁFICOS DEL ÚTERO LUEGO DEL PARTO

En la industria equina, los incentivos económicos influyen sobre los criadores para intentar tener intervalos entre partos de 12 meses o menos. Para esto, es necesario muchas veces servir a las yeguas en el primer estro post parto. Sin embargo, se ha reportado una menor fertilidad en las yeguas que son servidas en el primer periodo ovulatorio post parto en comparación con aquellas servidas en ciclos subsecuentes (Ishii et al., 2001; Lowis and Hyland, 1991; Merkt and Gunzel, 1979; Sullivan et al., 1975; Woods et al., 1987), también se han reportado mayores tasas de perdida embrionaria temprana en yeguas servidas en el primer ciclo (Lieux, 1980; Lowis and Hyland, 1991; Merkt and Gunzel, 1979; Platt, 1973). Esta menor fertilidad puede deberse a una falla en la eliminación de los microorganismos durante la involución uterina, a la introducción de microorganismos durante el servicio o a una reparación endometrial inadecuada en relación al momento en que el embrión ingresa al útero. Además, se ha demostrado que la presencia de fluido en el útero durante el estro y el diestro reduce la fertilidad de las yeguas (Adams et al., 1987; McKinnon et al., 1987a; McKinnon et al., 1988).

Un estudio realizado por McKinnon et al., 1988, tuvo como finalidad evaluar dos hipótesis: 1) la involución uterina y la acumulación de fluido puede ser monitoreada efectivamente por ecografía y utilizada para predecir la fertilidad de yeguas servidas durante el primer periodo ovulatorio post parto, y 2) el retraso en la ovulación con progestinas puede resultar en mejores tasas de preñez en yeguas servidas en el primer periodo ovulatorio post parto. Luego del parto el cuerno gestante tuvo mayor tamaño que el no gestante por un promedio de 21 días (rango de 15 a 25). La involución uterina fue más evidente en la unión del cuerpo con el cuerno. Cuando los resultados de tres ecografías realizadas en un periodo de cinco días eran similares, se consideraba que el útero había involucionado. En promedio, la involución uterina era completa a los 23 días (rango de 13 a 29 días). La cantidad y calidad del fluido uterino no se vio afectada por el tratamiento con progestinas. El numero de yeguas con fluido uterino detectable disminuyo luego del día 5 post parto. El fluido uterino disminuyó en cantidad y mejoró en calidad entre los días 3 y 15. Un número reducido de yeguas (P◎0.005) se preñó cuando había fluido uterino durante el primer periodo ovulatorio post parto (3 de 9, 33%), en comparación con aquellas yeguas que no presentaron fluido (26 de 31, 84%). Las yeguas con fluido durante el servicio no presentaban mayores dimensiones uterinas que aquellas que no presentaban fluido. No hubo relación entre el tamaño uterino en el día de la ovulación y la tasa de preñez. En las yeguas tratadas con progestinas se retraso la ovulación y se mejoraron las tasas de preñez. Un mayor número de yeguas ($P<0.05$)

se preñó en el primer periodo ovulatorio post parto (23 de 28, 82%) al ovular luego del día 15, en comparación con aquellas que ovularon antes del día 15 (6 de 12, 50%). Este estudio demostró que la ecografía fue de utilidad en la detección de fluido uterino en yeguas post parto y que puede ser utilizada para determinar si una yegua tiene que ser servida o tratada durante el primer periodo ovulatorio post parto (McKinnon et al., 1988).

El fluido uterino puede ser espermicida durante el estro y servir como un medio de soporte excelente para la proliferación de las bacterias en cualquier momento. Además la presencia de fluido puede indicar una involución uterina ineficiente. Cuando el fluido se encuentra presente durante el diestro, puede asociarse a endometritis infecciosa y a luteólisis prematura o muerte embrionaria temprana (Adams et al., 1987). La cantidad de fluido uterino durante el primer periodo ovulatorio post parto parece estar relacionada al estado de involución uterina, y fue reducida o eliminada al retrasar el periodo ovulatorio con progestinas (McKinnon et al., 1988). El tratamiento con progestinas no solo permitió el tiempo suficiente para la eliminación del fluido uterino previo a la primera ovulación post parto, sino que también retrasó significativamente la primer ovulación. Se ha demostrado que el tratamiento con progestágenos retrasa el primer periodo ovulatorio post parto sin afectar la tasa de involución uterina (Loy et al., 1982; McKinnon et al., 1988; Pope et al., 1979; Sexton and Bristol, 1985). Se ha demostrado que la administración a largo plazo de progestinas a yeguas cíclicas normales no afecta negativamente la fertilidad (Squires et al., 1983). Sin embargo, el tratamiento con progestinas afectara los mecanismos de defensa uterinos (Evans et al., 1986; Winter, 1982) y por lo tanto se recomienda tener precaución en los tratamientos que se realicen en yeguas post parto o susceptibles a infección. Dado que la presencia de fluido uterino se asocia a tasas de preñez reducidas, y a que las tasas de preñez son mejores cuando se retrasa la ovulación, se ha sugerido que ambas técnicas pueden ser utilizadas para manipular estrategias de servicio y mejorar las tasas de preñez de yeguas normales servidas durante el primer periodo ovulatorio post parto (McKinnon et al., 1988).

Estudios posteriores en yeguas con acumulación de fluido intrauterino post parto han demostrado que aquellas yeguas que presentan acumulación de fluido durante el primer estro post parto también presentan una mayor incidencia de acumulación de fluido post servicio y que los tratamientos con oxitocina no disminuyen la incidencia de acumulación de fluido ni mejoran las tasas de preñez. Los lavajes uterinos realizados a las 36 a 48 hs post servicio en yeguas con fluido uterino luego del primer estro post parto tampoco mejoran las tasas de preñez (Schilela et al., 2001). En otro estudio se observo que las tasas de muerte embrionaria temprana fueron mayores ($p=0.015$) en aquellas yeguas que tuvieron acumulación de fluido intrauterino durante el primer estro post parto (30.5%) que en las que no lo tuvieron (11.1%) (Malschitzky et al., 2003a). Un estudio realizado en Australia muestra claramente la afirmación generalizada de que la fertilidad es menor y la muerte embrionaria es mayor cuando las yeguas son servidas en el primer estro post parto en comparación con el siguiente ciclo inducido con prostaglandina (Lowis y Hyland, 1991). Las tasas de preñez en el primer ciclo fueron de 47.9% en comparación con un 55.2% y las tasas de preñez general al final de la temporada de servicio fueron de 83.3% y de 89.7% respectivamente. Las pérdidas de preñez antes del día 45 fueron del 10% y 3.9% y luego del día 45 fueron de 9.3% y 3.6% respectivamente (Lowis y Hyland, 1991).

Los resultados de estudios clínicos, microbiológicos y hormonales realizados durante el puerperio proveyeron información útil para decidir utilizar o no el primer estro post parto ó iniciar una terapia durante este periodo de tiempo (Glatzel y Belz, 1995).

La interpretación de los resultados de los lavajes u otros tratamientos post parto (Blanchard et al., 1989; McCue y Hughes, 1990) debe ser realizada con precaución cuando todas las yeguas son tratadas en grupos diferentes, ya que la mayoría de las yeguas no necesita

tratamiento en el periodo post parto inmediato y nuestro objetivo debe ser identificar a aquellas que si lo necesiten.

ESTRATEGIAS DE SERVICIO EN EL PRIMER ESTRO POST PARTO

Las yeguas deben ser consideradas para servicio en el primer estro post parto si tuvieron un parto normal (ej. no distócico), si no sufrieron retención placentaria y si no tuvieron una descarga prolongada de fluidos (loquios) desde el útero.

1. Todas las yeguas son examinadas al día 2-3 post parto. Para este tiempo, pueden ser identificados los problemas que pueden haber ocurrido durante el parto. Nosotros creemos que este examen es crítico si queremos prevenir que las yeguas se transformen en "yeguas problema". Cada año identificamos yeguas que si son tratadas inapropiadamente se transformaran en desastres a largo plazo. Aproximadamente el 5% de las yeguas presentara restos placentarios (a pesar de un excelente manejo) y otro 5% tendrá problemas de metritis y daño uterino. Muchas (15%) tendrán una involución uterina retrasada probablemente por el tamaño aumentado del útero y el volumen de fluido presente. Estas yeguas son monitoreadas de cerca y tratadas agresivamente con grandes volúmenes de fluidos intrauterinos, drogas ecbólicas, antibióticos, antiinflamatorios.
2. Las yeguas post parto pueden ser tratadas con una infusión de antibióticos en una solución de Ringer lactato (RL) a los 2 o 3 días post parto. Esto puede ayudar a ciertas yeguas y prevenir contaminación iatrogénica.
3. Las yeguas sin anormalidades identificadas son re examinadas al día 9 o 10 post parto. Las yeguas no serán servidas antes del día 10. Si al día 9 o 10 la yegua ha ovulado se indica la administración de PGF2μ en seis días. Si no se detecta fluido uterino y el tono uterino es bueno puede programarse el servicio. Si existen dudas la yegua es tratada y/o reexaminada de acuerdo al tamaño folicular y a la presencia o ausencia de fluido. Sería raro que se le de servicio a una yegua en el primer estro post parto en lugar de a una yegua que no lo este, con un padrillo con una agenda ocupada (<150 yeguas por temporada con servicio natural).
4. Se evita el servicio de yeguas en el primer estro post parto si presentan fluido. Estas son tratadas y vuelven a ciclar.
5. Por último hay dos estrategias más a las que nos adherimos. En primer lugar solo servimos yeguas en el primer estro post parto que sean jóvenes y reproductivamente sanas (ej. menores de 10 años de edad y con una, dos o tres crías), y en segundo lugar, las yeguas que hayan sido confinadas sin ejercicio (ej. vareo) debido a problemas del potrillo tales como deformidades angulares, no son servidas en el primer estro post parto.

DIAGNÓSTICO DE LA ENDOMETRITIS

Hay muchas técnicas para diagnosticar la endometritis. Sin embargo ninguna es completamente confiable. Las técnicas más comunes aceptadas en la actualidad son: 1) palpación trans rectal, 2) examen vaginal con especulo, 3) cultivo bacteriano del contenido uterino, 4) citología del contenido uterino, 5) biopsia endometrial y 6) ultrasonografía.

Se realizó un estudio para examinar la eficacia de las técnicas de diagnostico individuales para predecir la endometritis (McKinnon et al., 1987a). El modelo experimental involu-

cró a 60 yeguas sanas que fueron tratadas con progesterona por 31 días, 50 de ellas fueron inoculadas con Streptococcus zooepidemicus. Las evaluaciones reproductivas comenzaron el primer día de tratamiento con progesterona, a los 13 días y a los dos y siete días posteriores al comienzo del régimen terapéutico. Por lo tanto, para las 60 yeguas experimentales hubo 240 exámenes por endometritis. El criterio utilizado para evaluar el grado de endometritis fue el siguiente: 1) detección ultrasonográfica de fluido endometrial, 2) exámenes vaginales con especulo, 3) citología del contenido uterino, 4) cultivo del contenido uterino, 5) cambios inflamatorios agudos y crónicos detectados por biopsia endometrial. A cada parámetro individual se le asignó un número del 0 al 3. Para evaluar si la yegua tenia endometritis se utilizo un índice total que iba desde el 0 al 18, calculado por la suma de cada componente de la evaluación reproductiva. Para determinar la eficacia de cada test diagnostico se calculó un valor predictivo para cada uno de los test (para cada puntuación ◎ a 0), y se lo comparó con un diagnóstico positivo de endometritis obtenido del índice de puntuación total a dos niveles diferentes de diagnóstico.

Los resultados de este modelo experimental sostienen dos conclusiones: 1) el cultivo bacteriano no fue tan preciso en la predicción de la endometritis como los demás métodos de diagnostico y 2) la detección por ultrasonografía de cualquier acumulación de fluido uterino fue un indicador preciso de endometritis (McKinnon et al., 1987a).

Este estudio tuvo varias limitaciones: 1) el modelo de endometritis fue dependiente de progesterona y puede no reflejar exactamente las condiciones naturales de ocurrencia. Un modelo dependiente de progesterona puede resultar en una mayor proliferación bacteriana, menor número y funcionalidad de neutrófilos y menor drenaje de los contenidos uterinos. 2) Ante la ausencia de un patrón independiente para determinar la endometritis (ej. para comparar las pruebas individuales contra un diagnóstico positivo o negativo de endometritis), el resultado predictivo en este estudio puede haber reflejado con mayor precisión la influencia individual de cada componente en el índice total de puntuación.

A pesar de estos inconvenientes, este estudio demostró la utilidad de la ultrasonografía en el diagnostico de la endometritis. La aplicación de la ultrasonografía se vuelve aun más aparente cuando se considera que ésta no es invasiva. Las 10 yeguas control no inoculadas tratadas con progesterona desarrollaron endometritis, probablemente inducida por la invasión repetida del útero para colectar los datos durante el estudio. También puede concluirse que a pesar de la utilización de técnicas aceptadas de higiene, la invasión del útero en yeguas en las que predomina la progesterona resulta en endometritis. Otros autores han hecho asociaciones similares (Hinrichs et al., 1992).

LA YEGUA PROBLEMA

Valoración pre servicio

La ultrasonografía es fundamental para cualquier programa de servicio en yeguas problema (LeBlanc, 2008 a; LeBlanc, 2008b; McKinnon y Voss, 1993). La principal meta de la evaluación pre servicio es determinar si la yegua posee un ambiente uterino capaz de soportar a los espermatozoides por el tiempo suficiente para que ellos puedan alcanzar el oviducto en condiciones para iniciar la fertilización. Solo toma un par de horas para que los espermatozoides atraviesen la unión útero tubárica (UUT) y se mantengan relativamente libres de los productos tóxicos del útero. Sin embargo, cuando se mezclan los productos de la inflamación con los espermatozoides, se produce una disminución inmediata en la motilidad de los mismos, la cual es directamente proporcional a la cantidad de productos inflamatorios. La adición de fluido uterino grado 1 y 2 a los espermatozoides previo a la

inseminación de las yeguas resulto en una menor tasa de recuperación embrionaria (P<0.05) (Squires et al., 1989). Se reportó que la adición de diluyente al fluido uterino previo a la colocación de los espermatozoides detuvo el descenso en la motilidad "in vitro" (Squires et al., 1989). Sin embargo, parece ser que el enfoque más lógico para obtener mejores tasas de fertilidad es la remoción de los productos de la inflamación del útero previo a la inseminación. Para cumplir con estos objetivos, las yeguas deben ser examinadas a comienzos del estro. La identificación ultrasonográfica de fluido uterino y los resultados del cultivo y sensibilidad son utilizados para determinar si los lavajes uterinos, los agentes ecbólicos como la oxitocina y/o el clorprostenol (Combs et al., 1996; Leblanc et al., 1994; LeBlanc, 1997; McKinnon y Voss, 1993; Pycock, 1994; Pycock y Newcombe, 1996), los antibióticos locales o la combinación de todo lo anterior es necesaria para obtener un útero libre de productos de la inflamación al momento del servicio.

Servir yeguas destinadas a regresar al estro implica un uso inapropiado del tiempo, por lo tanto las yeguas que poseen una acumulación anormal de fluido en el útero detectado al momento del servicio deben recibir una dosis de PGF2 lo antes posible.

Se ha demostrado que el lavaje uterino con Ringer lactato y su remoción previo al servicio no es deletereo (Vanderwall y Woods, 2003), y debe ser considerado en casos en que se detecte una cantidad considerable de fluido previo al servicio y la yegua deba ser servida si o si.

Manejo del servicio

Si el ambiente uterino fue preparado correctamente para el servicio, nuestra meta es prevenir contaminaciones al momento del servicio y posterior a éste. Es claro que la contaminación es más fácil de controlar con la IA que con el servicio natural. Sin embargo, ambas técnicas resultan en una introducción de bacterias. Los primeros estudios en esta área fueron reportados por Kenney y colegas en 1975 (Kenney et al., 1975). Ellos demostraron que el semen colectado de manera higiénica de padrillos no infectados, contiene numerosos tipos de bacterias aeróbicas y hongos. Se colectaron 8 eyaculados de 5 padrillos y el numero de microorganismos aeróbicos colectados varió entre 0.09 y 36 millones. Sin embargo, la adición al semen crudo de diluyentes a base de leche descremada que contengan una combinación de penicilina-estreptomicina (1,500 UI/ml y 1,500 µg/ml respectivamente) o sulfato de gentamicina (1mg/ml) no dio lugar a crecimiento en ninguno de los sub cultivos de las muestras tratadas, incluyendo el tiempo 0 que fue unos 5 minutos después de la exposición. Hubo gran crecimiento en todos los sub cultivos de semen crudo (Kenney et al., 1975). Las bacterias aeróbicas comúnmente aisladas de uretra, semen y prepucio de padrillos son *E. coli* y otros coliformes, *Pseudomona aeruginosa, Streptococcus beta hemolítico y no hemolítico (S. zooepidemicus), Klebsiella sp., Stafilococcus hemolítico y no hemolítico, Proteus sp. y Corinebacterium.* Experimentos posteriores han demostrado una eliminación efectiva de las bacterias sin afectar la motilidad espermática al utilizar diluyentes seminales que contengan penicilina-gentamicina o sulfato de polimixina B (1,000 UI/ml). Por lo tanto parece que la adición al semen crudo de diluyentes seminales que contengan los antibióticos apropiados es un método que asegura la contaminación mínima al momento del servicio (Arriola y Foote, 1982; Blanchard et al., 1987; Danek et al., 1994; Padilla y Foote, 1991; Timoney et al., 1979; Vaillancourt et al., 1993). Es importante recordar que algunos antibióticos afectan la motilidad espermática a altas concentraciones y pueden también afectar negativamente la fertilidad (Jasko et al., 1993; Pickett et al., 1987). En la actualidad nosotros recomendamos la utilización de Ticarcilina, Timentin o Amikacina a 1 mg/ml en el diluyente.

Inseminación Artificial

En lo posible, las yeguas deben ser inseminadas en ausencia de cirugías reproductivas como la de Caslick. La región perineal debe ser lavada y secada como se describió previamente y luego se procede a inseminar con 500 x 10^6 espermatozoides con motilidad progresiva mezclados con un diluyente con antibióticos. Es importante la correcta limpieza del padrillo y del equipamiento de colección. Para asegurar que los antibióticos tengan el tiempo suficiente para eliminar el crecimiento bacteriano debe incubarse la muestra a 37°C por al menos 15 minutos previo a la inseminación. Si se requiere de un intervalo mayor, el semen diluido debe ser refrigerado a 20°C y mantenerse hasta por 12 hs (Francl et al., 1987). Si se necesita mantener por un tiempo mayor, debe refrigerarse a 4°C (Douglas-Hamilton et al., 1984). Para reducir al mínimo la cantidad de microorganismos se desarrolló un método para "lavar" los espermatozoides (Kenney et al., 1975) mediante la dilución con un diluyente con antibióticos seguido de una centrifugación a 300G para producir un pellet suave, decantación del sobrenadante y resuspensión del pellet en diluyente atemperado. Esta técnica tiene la ventaja de remover gran parte del plasma seminal, el cual reduce la motilidad luego de periodos prolongados de incubación con daño mínimo a los espermatozoides (Pickett et al., 1975), sin embargo esta técnica consume tiempo y puede no ser siempre necesaria.

Servicio natural

En el servicio natural, las yeguas y padrillos deben ser lavados correctamente. Debe evitarse la utilización de desinfectantes fuertes que puedan causar un sobre crecimiento de bacterias potencialmente patógenas luego de un uso prolongado. Se ha descripto una técnica para minimizar la contaminación mediante una infusión de 100 a 300 ml de diluyente con antibióticos previo al servicio. Esta técnica tiene ventajas, sin embargo hay que tener precauciones en su uso. Para obtener un a máxima eficiencia reproductiva deben depositarse 500 x 10^6 espermatozoides con MP en el tracto reproductivo. Sin embargo, concentraciones más bajas de espermatozoides son efectivas en padrillos con alta fertilidad. Esta información deriva de la IA con bajos volúmenes de semen mezclado con diluyente. Información reciente indica que la concentración espermática y el volumen de inseminación pueden ser factores importantes en la fertilidad. Cuando las yeguas fueron inseminadas con 250 x 10^6 espermatozoides con MP en un volumen de 100 ml de diluyente la tasa de recuperación embrionaria se vio disminuida (13.6%, P0.001) en comparación con yeguas inseminadas con la misma concentración espermática de los mismos eyaculados pero con un volumen de 10 ml de diluyente (70.6%) (Squires et al., 1989). Estos hallazgos son importantes cuando las yeguas deben ser servidas por servicio natural con padrillos que, debido a servicios frecuentes, pueden tener bajas concentraciones de espermatozoides en volúmenes de eyaculado normales (30 a 150 ml) y por ende concentraciones espermáticas por debajo del umbral para una fertilidad normal. Nuestra técnica para aquellas yeguas que son servidas por servicio natural es realizar evaluaciones ultrasonográficas para detectar la calidad y cantidad de fluido combinado con los resultados de cultivo y sensibilidad para determinar el tratamiento optimo. Por ejemplo, si las yeguas tienen grandes volúmenes de fluido, se realizan previo al servicio lavajes uterinos con grandes volúmenes de soluciones como Ringer lactato, Solución salina fosfatada buferada de Dulbecco, que no se espera que tengan efectos adversos sobre la sobrevida de los espermatozoides si son colocadas inmediatamente previo al servicio. La infusión de fluidos a alta temperatura (41 a 45°C) o de oxitocina, puede ayudar a la evacuación del contenido uterino. El objetivo es dejar el útero libre de productos inflamatorios y permitir que los espermatozoides puedan pasar sin problemas hacia el oviducto antes de que se liberen más productos de la inflamación. Se ha demostrado que el lavaje con Ringer

lactato y su recuperación del útero de yeguas inmediatamente previo al servicio no tiene efectos adversos (Vanderwall y Woods, 2003). Si se detectan pequeñas cantidades de fluido uterino puede realizarse una infusión con antibióticos previo al servicio (⊚12hs). Si el fluido uterino es detectado al momento del servicio programado, dependiendo del tipo y volumen del mismo, la yegua puede ser reciclada, se le puede infundir un volumen pequeño de diluyente con antibióticos (50 ml) inmediatamente previo al servicio, o se le puede colocar oxitocina EV y volver a examinarla en 1 a 2 hs (LeBlanc et al., 1994; Neuwirth et al., 1995). Cuando se organiza el servicio de yeguas problema, se destina mucho esfuerzo en tratar de servirla una sola vez, justo antes de la ovulación (⊚12 hs). Se realiza de rutina la inducción de la ovulación con Gonadotrofina Coriónica humana (hCG) o acetato de deslorelina (ver capitulo de Inducción de la Ovulación - McKinnon y McCue-). Las yeguas son servidas sin importar el número de folículos pre ovulatorios y las ovulaciones múltiples son fomentadas activamente. Hay unas pocas drogas efectivas, disponibles comercialmente para aumentar el número de ovulaciones por ciclo. La hormona folículo estimulante recombinante (eFSH) (ver capitulo de Superovulación, Squires), aunque es efectiva, es muy cara para su utilización en equinos y ya no se encuentra disponible comercialmente. La inmunización contra una subunidad de la inhibina ha sido demostrada efectiva al aumentar las tasas de ovulación en yeguas (McCue et al., 1992; McKinnon et al., 1992). Las tasas de concepción son proporcionales a las tasas de ovulación (Squires et al., 1987), por lo que el tratamiento mediante la inmunización contra la inhibina debería mejorar las tasas de preñez en yeguas normales, sub fértiles y en yeguas servidas con padrillos sub fértiles. Si se diagnostican preñeces múltiples a tiempo, con un manejo reproductivo intenso, la reducción de un mellizo debería ser de baja dificultad (ver capitulo de Manejo de mellizos - McKinnon).

Manejo post servicio

La finalidad de las terapias en el periodo inmediatamente posterior al servicio es: a) reducir la infección y la inflamación para crear un ambiente uterino capaz de soportar una preñez y b) prevenir contaminaciones posteriores. Los espermatozoides se encuentran a salvo en el oviducto a las 4 horas del servicio y están protegidos por la unión útero – tubárica (UUT) de los productos inflamatorios del útero y/o de los tratamientos realizados en el mismo. El embrión no será transportado desde el oviducto hacia el útero a través de la UUT hasta alrededor del día 5.5 a 6 luego de la ovulación; sin embargo, como la mayoría de las terapias intrauterinas generan algún grado de respuesta inflamatoria y para permitir el tiempo suficiente para que el material extraño sea absorbido o eliminado, no se realizan tratamientos luego del día 4 post ovulación. El cérvix comienza a exhibir mayor tono y se transforma en una barrera a la infección a los dos días de la ovulación, sin embargo si existe inflamación del tracto reproductivo, este se mantiene más relajado. Sumado a esto, el cuerpo lúteo es resistente a la $PGF_{2\mu}$ liberada por las respuestas inflamatorias locales hasta el día 5 post ovulación. La respuesta uterina al servicio y la contaminación es evaluada por ultrasonografía aproximadamente a las 12 a 24 hs posteriores al servicio. Si no se observa fluido, pueden no aplicarse tratamientos o administrarlos como se indicó diariamente por dos días más. Si se detectan pequeñas cantidades de fluido se aplica el mismo tratamiento, previo lavaje del útero con Ringer lactato. La solución salina es irritante especialmente con un pH bajo (Pascoe et al., 1989). Usualmente 1 a 2 litros son suficientes para remover los productos inflamatorios. Si se detectan grandes cantidades de fluido deben realizarse lavajes de alto volumen hasta que el fluido que se recupera se encuentre libre de detritus. Puede agregarse oxitocina (20 a 40 UI/lt) a las soluciones de lavaje y/o administrarla por vía EV. La oxitocina aumenta las contracciones miometriales en tractos reproductivos en los que dominan los estrógenos (Jones et al., 1991; Liu et al., 1991) y ayuda a la expulsión de los

materiales. La administración de oxitocina provoca contracciones uterinas por un periodo de 30 a 45 minutos. Puede administrarse alternativamente clorprostenol a aquellas yeguas que no evacuen el contenido uterino en respuesta a la oxitocina. Las contracciones uterinas luego de la administración de clorprostenol persisten por 2 a 4 hs (LeBlanc, 2008a).

De la discusión precedente debe quedar claro cuan fundamental es la ultrasonografía para tomar las decisiones de manejo correctas al momento de servir las yeguas.

Efecto del fluido uterino en las tasas de preñez y de muerte embrionaria temprana

Las yeguas con fluido intrauterino detectado luego de la ovulación tienen tasas de preñez reducidas y mayor número de muertes embrionarias tempranas (MET).

Se diseño un estudio para determinar la influencia del fluido uterino en las tasas de preñez y de MET (McKinnon et al., 1987a). De este estudio se concluye que: 1) la presencia de pequeñas cantidades de fluido durante el estro en yeguas cíclicas no afectó las tasas de preñez al día 11 o 50; 2) el fluido uterino detectado al día 1 o 2 post ovulación no afectó las tasas de preñez al día 11, pero se asoció a un aumento significativo en las tasas de MET y una reducción en las tasas de preñez al día 50; y 3) la presencia de fluido uterino durante el diestro se asoció con una disminución significativa en las tasas de preñez al día 50. Otro estudio reveló que la incidencia de fluido durante el diestro (12/43, 28%) se asocia con la presencia de procesos inflamatorios indicados por una alta puntuación de biopsia uterina, concentraciones reducidas de progesterona y periodos inter ovulatorios mas cortos (Adams et al., 1987). Las yeguas con fluido uterino durante el diestro tuvieron tasas de preñez más bajas al día 11 y mayores tasas de muerte embrionaria temprana al día 20 que aquellas yeguas que no tuvieron fluido. El perfil de progesterona y la duración de los intervalos inter ovulatorios en yeguas con inflamación uterina sugirió que la muerte embrionaria fue debida a la luteólisis inducida por el útero en lugar de una insuficiencia luteal primaria (Adams et al., 1987). Los efectos sobre las tasas de preñez de los tres tratamientos para remover el fluido uterino se evaluaron en 1267 yeguas (Pycock and Newcombe, 1996). Las yeguas fueron servidas y asignadas en rotación a cuatro grupos de tratamiento: 1) controles no tratados, 2) infusión intrauterina de antibióticos de amplio espectro, 3) inyección endovenosa de oxitocina, 4) inyección endovenosa de oxitocina seguido de antibióticos intrauterinos. Las yeguas fueron evaluadas por preñez a los 13 a 15 días y 27 a 30 días post ovulación por ultrasonografía. La tasa de preñez para el grupo 4 (72%) fue mayor que para el grupo 2 (64%, $P< 0.01$) y que para el grupo 3 (63%, $P< 0.01$). Las tasas de preñez para los grupos 2 y 3 fueron mayores que para el grupo 1 (56%, $P< 0.01$). El tratamiento con antibióticos y oxitocina tuvo un efecto beneficioso adicional lo que sugirió dos modos de acción diferentes de la combinación de tratamientos, actividad antibacteriana y drenaje del fluido. En las yeguas no tratadas hubo mayor acumulación de fluido luego del servicio, y esta fue la razón más probable de su menor tasa de preñez (Pycock and Newcombe, 1996). En nuestro programa de servicio la cantidad y calidad del fluido detectado por ecografía es utilizado para determinar cómo tratar a la yegua. Grandes volúmenes de mala calidad (grados 1 o 2) se tratan con lavajes con solución salina, mientras que volúmenes pequeños de grado 4 a menudo son tratados con antibióticos locales y oxitocina y/o clorprostenol. Cuando el fluido es detectado posterior a la ovulación los esfuerzos son dedicados a reducir el fluido y la inflamación, mediante la utilización de agentes anti inflamatorios no esteroidales EV, antibióticos intrauterinos, inmunoestimulantes (Rohrbach et al., 2007) y oxitocina sistémica. El clorprostenol no es utilizado posterior a la ovulación debido al riesgo de modificación de la función del CL (Brendemuehl, 2002; Gunthle et al., 2000; Nie et al., 2003a; Nie et al., 2003b).

Quistes uterinos

Previo a la ultrasonografía los quistes uterinos eran diagnosticados comúnmente en exámenes *post mortem* y en ocasiones por palpación rectal (Kenney y Ganjam, 1975). Posteriormente han sido diagnosticados por histeroscopia y ultrasonografía (McKinnon et al., 1987c). Los quistes uterinos están llenos de fluido y aparentemente tienen dos orígenes. Los quistes endometriales surgen de las glándulas endometriales y son comúnmente ⌀ 10 mm de diámetro. La segunda clase de quistes uterinos son de origen linfático (Fig. 3 a y b) y en general son más grandes que los endometriales. Son comunes en yeguas viejas (McKinnon et al., 1987c; Stanton et al., 2004; Tannus y Thun, 1995), y han sido asociados tanto con biopsias uterinas normales como anormales (Kenney and Ganjam, 1975). El tamaño de los quistes uterino puede ser indicativo del origen. Se han reportado pocos datos sobre la tasa de crecimiento de los quistes uterinos. A pesar de los quistes ocasionalmente grandes, es poco probable que crezcan a una tasa similar a la de las vesículas embrionarias tempranas (días 10 a 20). A la ecografía los quistes son comúnmente redondos, en ocasiones de bordes irregulares, múltiples o con compartimentos (lagunas linfáticas) (Fig. 3 c-f). La mayoría de los quistes son luminales, sin embargo en ocasiones pueden detectarse quistes transmurales o sub serosos. El movimiento del embrión (días 10 a 16), la presencia de reflejo especular, la apariencia esférica y la tasa de crecimiento deben ayudar en su diferenciación con los quistes uterinos. La relación entre la infertilidad y los quistes uterinos es axiomática dado que los quistes aumentan en número a medida que la yegua envejece (Tannus and Thun, 1995). Los quistes pueden impedir el movimiento del embrión, restringiendo la habilidad de la vesícula de prevenir la luteólisis luego del día 10 (McDowell et al., 1988). Más avanzada en la preñez, el contacto entre el quiste y el saco vitelino o el alantoides puede impedir la absorción de nutrientes (Fig. 3 f). Esto puede ser de mayor importancia cuando se considera que los quistes uterinos se localizan con mayor frecuencia en la unión del cuerno y el cuerpo uterino (Tannus and Thun, 1995),el cual es el lugar más común de fijación de las vesículas (Ginther, 1983). Finalmente los quistes son indicativos de afección uterina. Pueden reflejar senilidad o estar asociados con fibrosis endometrial. Se ha reportado una asociación entre el numero de quistes uterinos, la edad de la yegua (Ginther, 1983) y la puntuación de la biopsia endometrial (Adams et al., 1987). El numero de tratamientos propuestos para los quistes uterinos refleja la incapacidad de cualquier tratamiento individual de ser consistentemente útil. Se ha intentado la ruptura de las estructuras llenas de líquido mediante pinzas de biopsia uterinas, cirugía, aspiración por aguja fina y punción por histeroscopia. También se ha descripto la remoción electro coagulativa de los quistes. También se ha intentado el curetaje endometrial y lavajes repetidos con salina atemperada (40 a 45°C). Aunque no hay reportes sobre la eficiencia de cada uno de estos tratamientos, el curetaje endometrial y lavaje con salina es aplicado frecuentemente para tratar el problema primario, el cual parecería ser un bloqueo linfático. De un estudio se concluyo que: 1) los quistes uterinos detectados por ultrasonografía eran de origen linfático; 2) los quistes uterinos no cambiaron rápidamente de forma o tamaño, aunque fueron más difíciles de detectar durante el estro; 3) el tratamiento con radiación infra roja no fue efectivo; 4) no hubo una ubicación consistente de los quistes uterinos y 5) los quistes uterinos fueron asociados comúnmente con endometritis crónica, infiltrativa, linfocitica (McKinnon et al., 1987a).

Otro estudio realizado sobre 259 yeguas fértiles SPC (Tannus and Thun, 1995) reveló que la incidencia de quistes uterinos fue de un 22.4%. De los 95 quistes observados durante el estudio, 87.4% se localizó en los segmentos medios y posteriores de ambos cuernos uterinos. El tamaño de todos los quistes varió entre 3 y 48 mm. Cuando todas las yeguas fueron asignadas a tres grupos etarios, A < 7 años (n=116), B 7 a 14 años (n=117) y C > 14 años (n=26), se observó un aumento significativo en el numero de quistes con el avance de

la edad (4.3%, 29.1% y 73.1%, respectivamente). Las tasas de preñez por temporada a los días 14 y 40 fue significativamente menor ($P < 0.01$) en yeguas con quistes (77.6% y 71.4%) en comparación con yeguas sin quistes (91.5% y 88.0%). Esto sugirió a los autores que la presencia de quistes uterinos juega un rol importante en la reducción de la fertilidad de las yeguas SPC (Tannus and Thun, 1995).

En nuestra experiencia los quistes son más comúnmente encontrados en yeguas viejas y también son más comunes en el post parto inmediato en la unión del cuerpo con el cuerno uterino. Los quistes uterinos más comunes son pedunculados y luminales, sin embargo también pueden encontrarse no pedunculados y transmurales. Nuestro tratamiento preferido para los quistes uterinos, cuando creemos que el tratamiento es necesario, ha sido la dilatación del cérvix en yeguas en estro y la ablación manual del quiste. Esto se realiza colocando el quiste entre dos dedos y desgarrándolo o aplastándolo. Los quistes no pedunculados pueden ser más difíciles de destruir de esta manera, sin embargo no parecen causar muchos problemas. Recientemente se ha descripto una técnica simple de lazo para remover quistes pedunculados (DeLuca et al., 2009). El elemento consiste de dos pipetas de inseminación unidas por un trozo largo y grueso de material de sutura que forma el lazo. El material de sutura es colocado alrededor del quiste y fijado en la base pedunculada del mismo. Un movimiento de sierra es utilizado para seccionar el pedúnculo (Fig. 3 g y h).

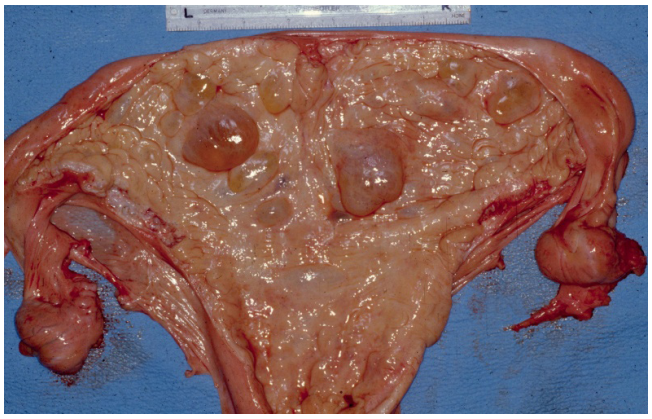


Fig. 3a Quistes uterinos en la superficie del endometrio.

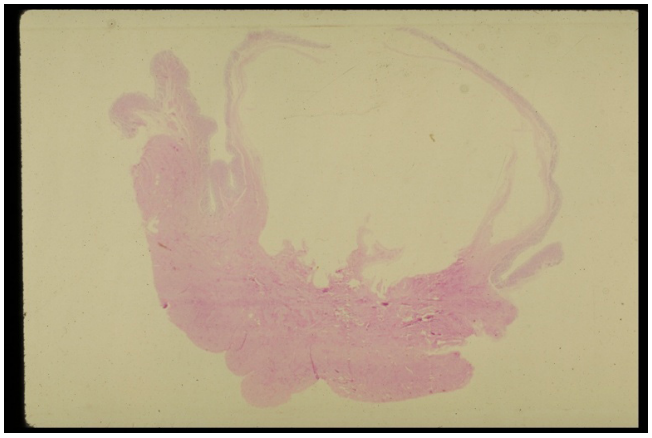


Fig. 3b Corte histológico de un quiste linfático uterino (X2).

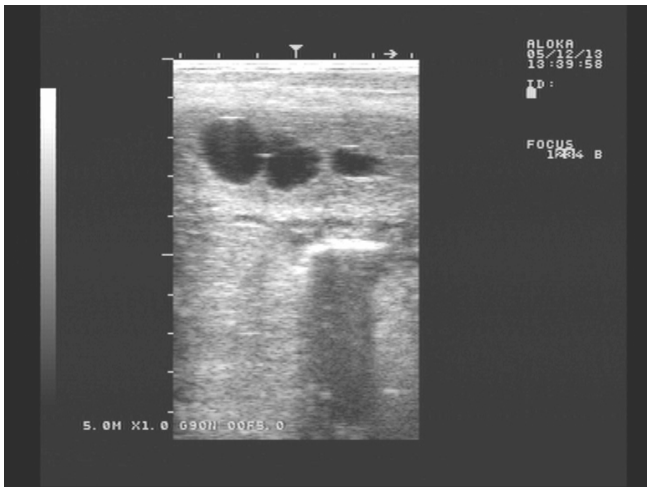


Fig. 3c Preñez de día 12 frente al cérvix con dos quistes de tamaño similar a craneal.

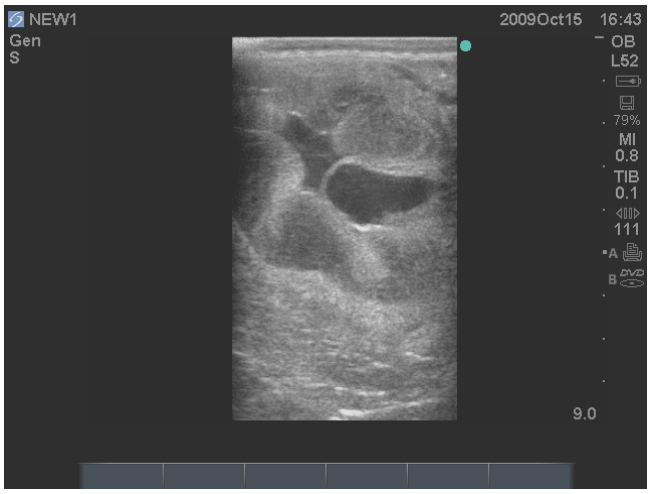


Fig. 3d Quiste con pliegues inflamatorios y fluido

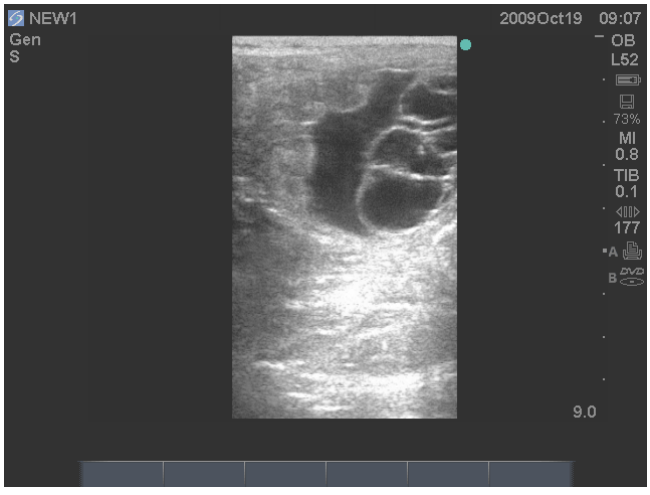


Fig. 3e Múltiples quistes asociados a una preñez en la unión del cuerpo con el cuerno.

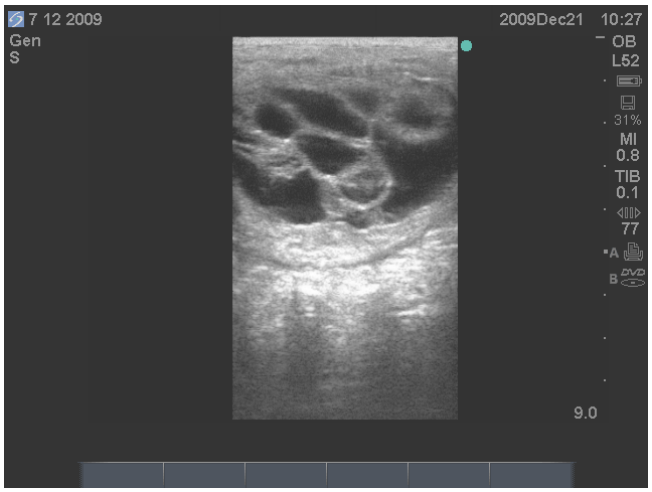


Fig. 3f Alto número de quistes en la unión del cuerpo con el cuerno junto a una preñez. Este número de quistes puede interferir con la absorción de nutrientes por parte del embrión aunque no hay estudios definitivos que lo prueben.

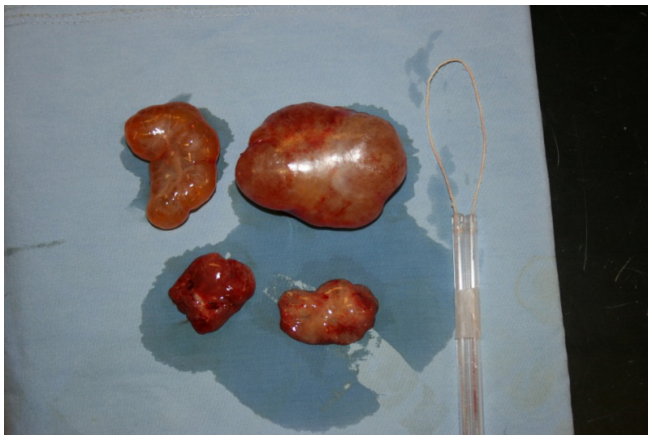


Fig. 3g Quistes uterinos pedunculados removidos con la técnica del lazo.

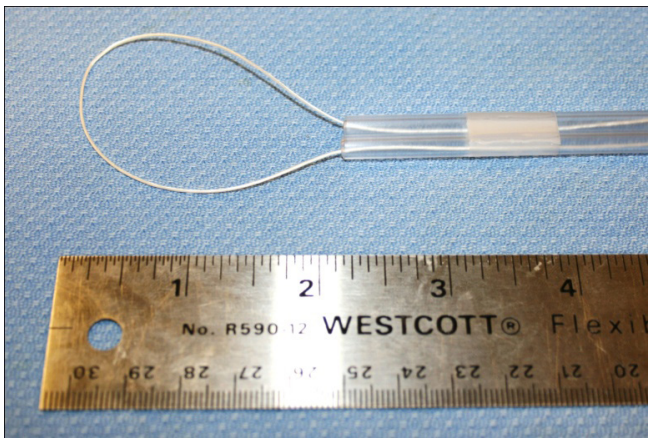


Fig. 3h El material de sutura en las pipetas es utilizado para cortar el pedúnculo de los quistes, mientras que las pipetas protegen al útero.

Pneumoútero

El aire es reconocido por la presencia de múltiples reflejos hiperecoicos (Fig. 4 a y b), en ocasiones aparece un artefacto de reverberación ventral y parece ser mas prevalente a craneal del cérvix, aunque puede estar presente en el cuerpo y cuernos. Cuando el aire se encuentra a las 24 hs o menos de la IA se considera normal. Sin embargo no esperamos detectar esto en yeguas normales luego de 24 hs del servicio. La presencia de aire en el útero de yeguas que no han sido muestreadas o servidas recientemente es una indicación de peumoútero y refleja un fallo en la competencia de los labios vulvares, esfínter vestíbulo vaginal y/o cérvix (McKinnon et al., 1987a). En nuestra experiencia, esto ha sido utilizado para determinar cuando las yeguas necesitan ser suturadas, en particular cuando un examen clínico no sugirió la realización de este procedimiento. En ocasiones puede observarse aire en la yegua preñada; en estos casos el pronóstico para el mantenimiento de la gestación es reservado.

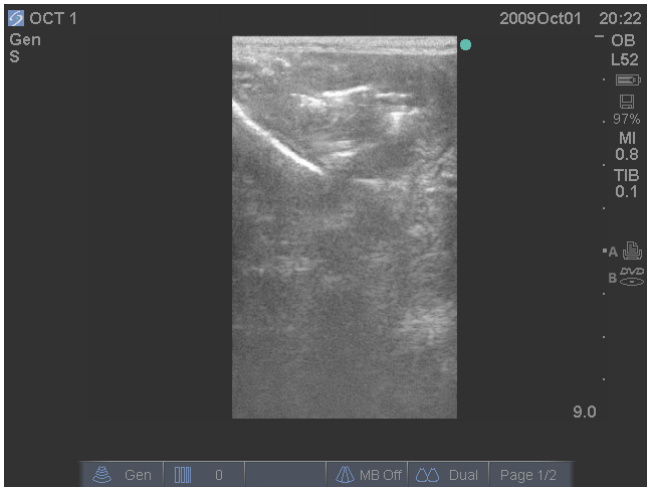


Fig. 4a El aire se observa como reflejos hiperecoicos en los cuernos uterinos.

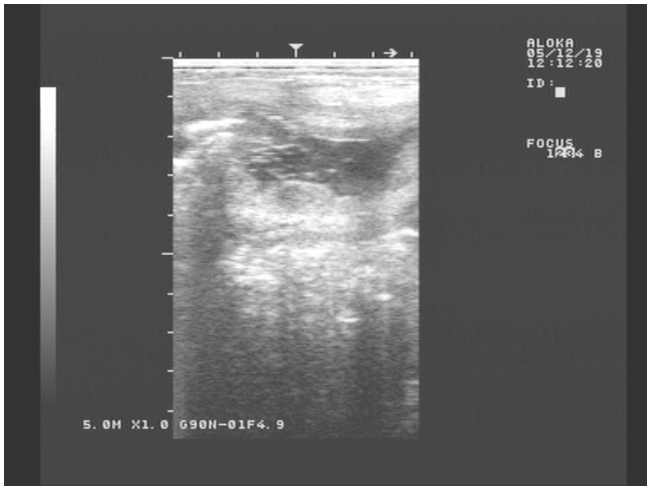


Fig. 4b Aire y fluido a craneal del cérvix.

Cuerpos extraños

En ocasiones se observan áreas altamente ecogénicas en el lumen uterino con una sombra concomitante, tales como las que se observan con los tejidos densos como el hueso fetal (Fig. 5a). Esto puede esperarse luego de la momificación. Nosotros hemos identificado una imagen ultrasonográfica similar que fue confirmada posteriormente como la punta de un hisopo de cultivo (Fig. 5b). Otra sustancia que crea una sombra ecográfica intensa es la presencia de membranas fetales retenidas. Estos casos son reconocidos en el primer examen post parto, sin embargo pueden no ser aparentes hasta que haya un aumento de la ecogenicidad. Además de esto hemos visto algunos casos interesantes como la calcificación de la superficie epitelial, material de sutura luego de una cesárea y detritus luego de tratamientos múltiples con suspensiones de antibióticos en yeguas que tienen reducida capacidad de excreción de material desde el útero. Las canicas (bolitas) que se colocan en el útero para simular un estado de pseudo-preñez son fácilmente visualizadas por ultrasonografía (Fig. 5 c y d).

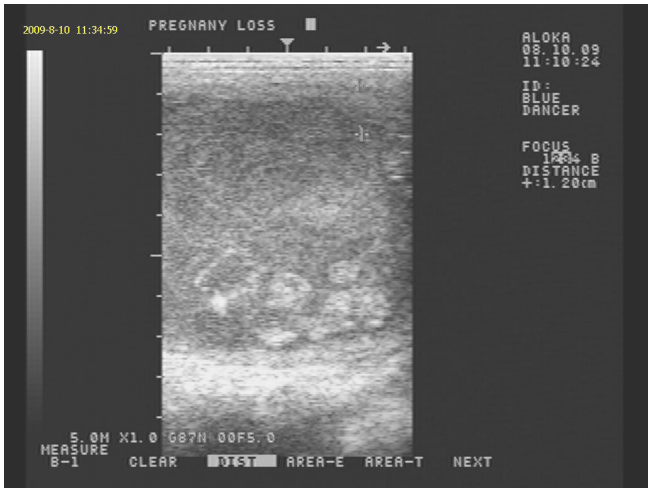


Fig. 5a Remanentes fetales en un útero con una gran cantidad de fluido grado 2.

Fig. 5b Masa ecogénica que fue identificada como la punta de un hisopo de cultivo.

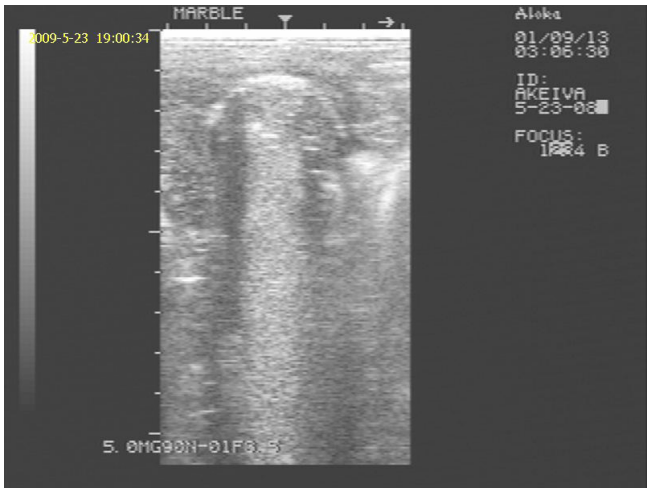


Fig. 5c Canica de vidrio en el útero.

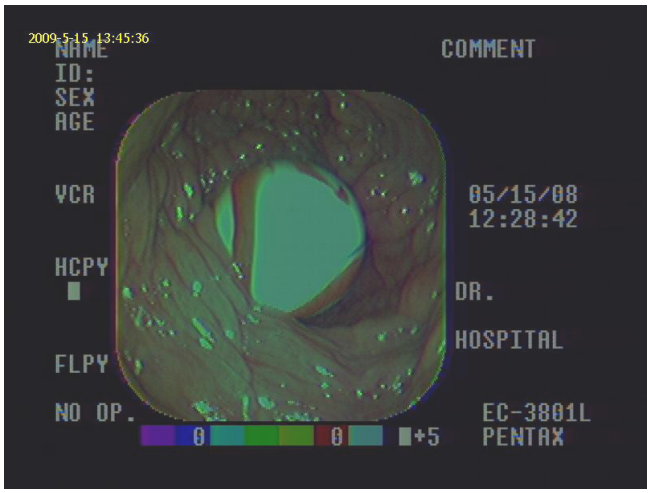


Fig. 5d Canica de vidrio visualizada por endoscopia.

Retención de copas endometriales

En una preñez normal las copas endometriales no son detectadas, sin embargo en ocasiones, luego de la MET y expulsión de fluidos fetales pueden volverse visibles. Las yeguas en circunstancias inusuales pueden retener las copas endometriales (Silva et al., 1995; Willis and Riddle, 2005) en estado activo por un largo periodo de tiempo (un año o más) a pesar de haber parido, abortado o sufrido de MET (Steiner et al., 2006). Estas yeguas se presentan como yeguas vacias en la siguiente temporada y típicamente poseen ciclos estrales irregulares con actividad ovárica anormal como folículos que se luteinizan sin ovular. Presumiblemente la actividad ovárica anormal está asociada a los altos niveles de gonadotrofina coriónica equina (eCG) que es secretada desde las copas retenidas. Las yeguas con copas retenidas pueden exhibir estros irregulares, prolongados o comportamiento de anestro. El diagnostico de retención de las copas endometriales puede ser sugerido por ultrasonografía y confirmado por endoscopia del útero o por la medición de las concentraciones séricas de eCG (Fig. 6). Las copas endometriales retenidas eventualmente serán removidas por una reacción inmunológica, pero esto puede tomar meses. No existe ninguna técnica disponible en la actualidad para acelerar la remoción de las copas endometriales persistentes (Steiner et al., 2006).

Fig. 6 Las copas endometriales retenidas en ocasiones pueden ser identificadas como placas hiperecoicas.

Adherencias uterinas

En ocasiones luego de un trauma severo al tracto reproductivo o luego de una irritación a causa de una endometritis pueden formarse adherencias uterinas transluminales. El fluido se acumula en la punta del cuerno afectado a causa de las secreciones constantes desde el oviducto o de la endometritis en el cuerno proximal a las adherencias. Este fluido puede localizarse fácilmente y debe hacer sospechar al clinico de una adherencia completa. El diagnostico puede confirmarse manualmente luego de dilatar suavemente el cérvix y si eso no es posible puede realizarse una infusión de fluido (ej. 1 lt de Ringer lactato) dentro del útero lo que deberá demostrar falta de ingreso de liquido a una parte del útero (comúnmente un cuerno). Cuando existen adherencias no es posible dilatar la punta del cuerno afectado debido a que el fluido no puede ingresar o ingresa parcialmente. Las adherencias pueden responder a la ruptura manual y a múltiples infusiones de antibióticos, sin embargo algunas parecen exacerbarse con la irritación del tratamiento y pueden responder mejor a cremas oleosas de corticoesteroides o a periodos de reposo de al menos tres semanas.

Patologías uterinas menos comunes

Las neoplasias uterinas, abscesos y hematomas pueden ser reconocidos por ultrasonografía. Los Leiomiomas uterinos no son poco comunes, sin embargo hay que realizar una evaluación detallada para detectarlos ya que su tamaño varía desde 10 mm a 60 mm. Estos son ligeramente más ecogénicos que el útero y se presentan como discretas masas redondeadas (Fig. 7 a-c).

La ultrasonografía puede ser de utilidad para el reconocimiento de capas de mucus y biofilms en el útero de la yegua (Fig. 2 g-i). La formación de biofilms es un mecanismo de protección de ciertas bacterias y se asocia con una mayor dificultad para la eliminación de la infección con los tratamientos convencionales. Las terapias más recientes y prometedoras para la remoción del mucus y biofilms son la N-Acetilcisteina (NAC) (30 ml de una solución al 20% en 150 ml de solución salina) (Gores-Lindholm et al., 2009) y la Trometamina - Acido Etilendiaminotetraacetico (tris-EDTA) (250 ml de EDTA 3.5 mM, tris 0.05 mM, pH 8. LeBlanc, 2008a).

Fig. 7a Leiomioma pequeño en el útero. Típicamente se encuentran en la submucosa o más profundamente y en ocasiones pueden ser removidos por extracción manual previa dilatación del cérvix.

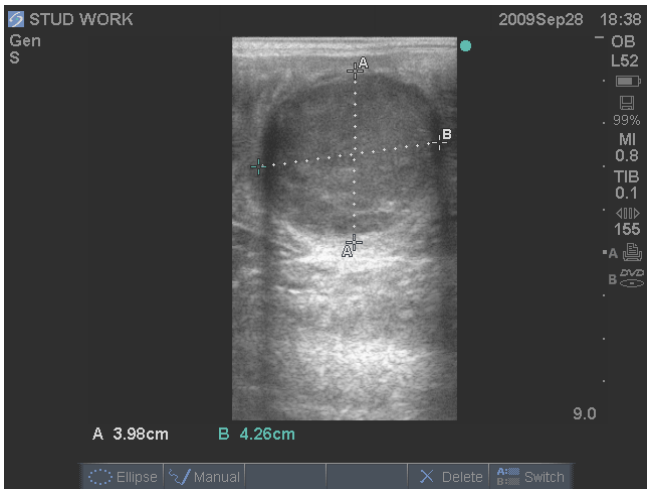


Fig. 7b Leiomioma de gran tamaño.

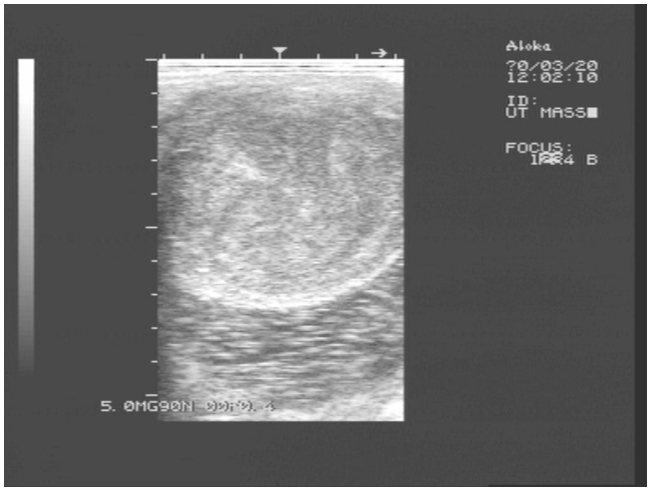


Fig. 7c Leiomioma de gran tamaño que ha sido remarcado mediante la infusión de Ringer lactato dentro del útero.

Evaluación del tracto reproductivo caudal

La ultrasonografía no ha sido de particular utilidad para el diagnostico de anormalidades en el cérvix. Generalmente el examen manual o mediante especulo es más útil. Una vez que el tracto reproductivo ha involucionado completamente y que la yegua está en diestro (cuando el cérvix debería estar completamente cerrado), el cérvix puede ser evaluado para determinar si es capaz o no de cerrarse. La involución es necesaria también para permitir la identificación de las capas muscular y mucosa que deben ser desbridadas y suturadas. Nosotros encontramos comúnmente desgarros cervicales cuando se nos refieren casos de yeguas problema. Además, es sorprendente cuantas yeguas con defectos cervicales llegan a preñarse.

La ultrasonografía puede ser útil para diagnosticar casos de hematomas vaginales y abscesos (ver arriba). Una evaluación cuidadosa puede revelar orina u otros fluidos en la vagina/vestíbulo en yeguas con problemas reproductivos (Fig. 8).

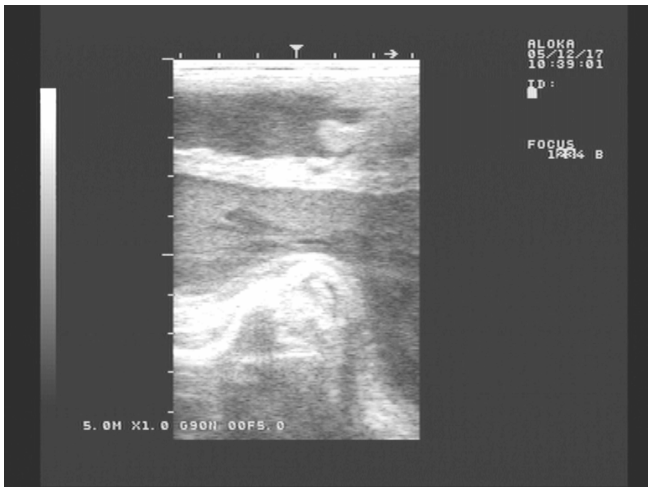


Fig. 8 La ultrasonografía fue útil para visualizar orina en la porción craneal de la vagina en esta yegua con reflujo vesico – vaginal.

REFERENCIAS

1. Adams, G. P., J. P. Kastelic, D. R. Bergfelt, and O. J. Ginther. 1987. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. J Reprod Fertil. Suppl 35:445-454.
2. Arriola, J. and R. H. Foote. 1982. Effects of amikacin sulfate on the motility of stallion and bull spermatozoa at different temperatures and intervals of storage. J. Anim. Sci. 54:1105-1110.
3. Blanchard, T. L., D. D. Varner, S. P. Brinsko, S. A. Meyers, and L. Johnson. 1989. Effects of postparturient uterine lavage on uterine involution in the mare. Theriogenology 32:527-535.
4. Blanchard, T. L., D. D. Varner, C. C. Love, J. P. Hurtgen, M. R. Cummings, and R. M. Kenney. 1987. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to Pseudomonas aeruginosa. Theriogenology 28:541-546.
5. Brendemuehl, J. P. Effect of oxytocin and cloprostenol on luteal formation, function and pregnancy rates in mares. Theriogenology 58[2-4], 623-626. 2002.
6. Ref Type: Journal (Full)
7. Causey, R. C. 2006. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. Vet J 172:405-421.

8. Combs, C. B., M. M. LeBlanc, L. Neuwirth, and T. W. Tran. 1996. Effects of Prostaglandin-F2-Alpha Cloprostenol and Fenprostalene on Uterine Clearance of Radiocolloid in the Mare (Vol 45, Pg 1449, 1996). Theriogenology 46:U3.
9. Danek, J., E. Wisniewski, W. Krumrych, and J. Dabrowska. 1994. Prevalence and Sensitivity to Antibiotics of Facultative Pathogenic Bacteria Isolated from the Semen of Stallions. Med. Weter. 50:385-387.
10. DeLuca, C. A., E. K. Gee, and P. M. McCue. 2009. How to remove to remove large endometrial cysts with an improvised snare: A simple technique for practitioners. Proc AAEP 55:328-330.
11. Douglas-Hamilton, D. H., R. Osol, G. Osol, D. Driscoll, and H. Noble. 1984. A field study of the fertility of transported equine semen. Theriogenology 22:291-304.
12. Evans, M. J., J. M. Hamer, L. M. Gason, C. S. Graham, A. C. Asbury, and C. H. G. Irvine. 1986. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra- uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. Theriogenology 26:37-50.
13. Francl, A. T., R. P. Amann, E. L. Squires, and B. W. Pickett. 1987. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20 degrees C. Theriogenology 27:517-525.
14. Ginther, O. J. 1983. Fixation and orientation of the early equine conceptus. Theriogenology 19:613-623.
15. Ginther, O. J., M. C. Garcia, D. R. Bergfelt, G. S. Leith, and S. T. Scraba. 1985. Embryonic loss in mares: Pregnancy rate, length of interovulatory intervals, and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. Theriogenology 24:409-418.
16. Glatzel, P. S. and J. P. Belz. 1995. Fertility in Mares After Disturbed or Undisturbed Puerperal Periods - Significance of Clinical, Microbiological and Hormonal Examinations. Berl. Mun. Tierarztl. Wochenschr. 108:367-372.
17. Gores-Lindholm, A., R. Causey, M. Calderwood-Mays, and M. M. LeBlanc. 2009. Effect of intra-uterine infusion of diluted N-Acetylcysteine on equine endometrium. Proc AAEP 55:326.
18. Griffin, P. G., E. M. Carnevale, and O. J. Ginther. 1993. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. Animal Reproduction Science 31:311-329.
19. Griggers, S., D. L. Paccamonti, R. A. Thompson, and B. E. Eilts. 2001. The effects of ph, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. Theriogenology 56:613-622.
20. Gunthle, L. E., P. M. McCue, V. J. Farquhar, and R. A. Foglia. 2000. Effect of prostaglandin administration postovulation on corpus luteum development in the mare. Proc Soc Therio139.
21. Hayes, K. E. N., R. A. Pierson, S. T. Scraba, and O. J. Ginther. 1985. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. Theriogenology 24:465-477.
22. Hinrichs, K., M. S. Spensley, and P. L. McDonough. 1992. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. Equine Veterinary Journal 24:457-461.
23. Ishii, M., T. Shimamura, A. Utsumi, T. Jitsukawa, M. Endo, T. Fukuda, and T. Yamanoi. Reproductive performance and factors that decrease pregnancy rate in heavy draft horses bred at the foal heat. J Equine Vet Sci 21[3], 131-136. 2001.
24. Ref Type: Journal (Full)
25. Jasko, D. J., S. J. Bedford, N. L. Cook, E. L. Mumford, E. L. Squires, and B. W. Pickett. 1993. Effect of Antibiotics on Motion Characteristics of Cooled Stallion Spermatozoa. Theriogenology 40:885-893.
26. Jones, D. M., E. D. Fielden, and D. H. Carr. 1991. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 44:357-368.
27. Kenney, R. M., R. V. Bergman, W. L. Cooper, and G. W. Morse. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares:Technique and preliminary findings. Proc. AAEP327-335.
28. Kenney, R. M. and V. K. Ganjam. 1975. Selected pathological changes of the mare uterus and ovary. J. Reprod. Fertil. Suppl 23:335-339.
29. Knutti, B., J. F. Pycock, G. C. Vanderweijden, and U. Kupfer. The influence of early postbreeding uterine lavage oil pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. Equine Vet Educ 12[5], 267-270. 2000.

30. Ref Type: Journal (Full)
31. Leblanc, M., L. Neuwirth, D. Mauragis, E. Klapstein, and T. Tran. 1994. Oxytocin Enhances Clearance of Radiocolloid from the Uterine Lumen of Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis. Equine. Vet. J. 26:279-282.
32. LeBlanc, M. M. 1997. Effects of Oxytocin, Prostaglandin and Phenylbutazone on Uterine Clearance of Radiocolloid. Pferdeheilkunde. 13:483-485.
33. LeBlanc, M. M. 2008a. The chronically infertile mare. Proc AAEP 54:391-407.
34. LeBlanc, M. M. 2008b. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. Theriogenology 70:421-429.
35. LeBlanc, M. M., L. Neuwirth, A. C. Asbury, T. Tran, D. Mauragis, and E. Klapstein. 1994. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. Equine Vet J 26:109-113.
36. Lieux, P. 1980. Comparative results of breeding on first and second post-foaling heat periods. Proc. AAEP129-132.
37. Liu, I. K. M., M. H. T. Troedsson, D. C. Williams, and J. R. Pascoe. 1991. Electromyography of uterine activity in the mare: comparison of single vs multiple recording sites. J. Reprod. Fertil. Suppl. 44:744.
38. Lowis, T. C. and J. H. Hyland. 1991. Analysis of post-partum fertility in mares on a thoroughbred stud in southern Victoria. Aust Vet J 68:304-306.
39. Loy, R. G., M. J. Evans, R. Pemstein, and T. B. Taylor. 1982. Effects of injected ovarian steroids on reproductive patterns and performance in post-partum mares. J. Reprod. Fertil. Suppl. 32:199-204.
40. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. Theriogenology 58[2-4], 495-498. 2002.
41. Ref Type: Journal (Full)
42. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. Pferdeheilkunde 19[6], 646-649. 2003a.
43. Ref Type: Journal (Full)
44. Malschitzky, E., A. Schilela, A. L. G. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season. Pferdeheilkunde 19[6], 641-645. 2003b.
45. Ref Type: Journal (Full)
46. McCue, P. M., N. J. Carney, J. P. Hughes, J. Rivier, W. Vale, and B. L. Lasley. 1992. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. Theriogenology 38:823-831.
47. McCue, P. M. and J. P. Hughes. 1990. The effect of postpartum uterine lavage on foal heat pregnancy rate. Theriogenology 33:1121-1129.
48. McDowell, K. J., D. C. Sharp, W. Grubaugh, W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1988. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. Biology Of Reproduction 39:340-348.
49. McKinnon, A. O., R. W. Brown, R. L. Pashen, P. E. Greenwood, and J. R. Vasey. 1992. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. Equine. Vet. J. 24:144-146.
50. McKinnon, A. O., E. L. Squires, E. M. Carnevale, L. A. Harrison, D. D. Frantz, A. E. McChesney, and R. K. Shideler. 1987a. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. Proc. AAEP605-622.
51. McKinnon, A. O., E. L. Squires, L. A. Harrison, E. L. Blach, and R. K. Shideler. 1988. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. Journal Of The American Veterinary Medical Association 192:350-353.

52. McKinnon, A. O., E. L. Squires, and J. L. Voss. 1987b. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract: Part I. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9:336-345.

53. McKinnon, A. O., E. L. Squires, and J. L. Voss. 1987c. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract: Part II. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9:472-482.

54. McKinnon, A. O. and J. L. Voss. 1993. Breeding the problem mare. In: A. O. McKinnon and J. L. Voss (Eds.) Equine Reproduction. pp. 368-378. Lea & Febiger, Philadelphia, London.

55. Merkt, H. and A. R. Gunzel. 1979. A survey of early pregnancy losses in West German thoroughbred mares. Equine. Vet. J. 11:256-258.

56. Neuwirth, L., M. M. LeBlanc, D. Mauragis, E. Klapstein, and T. Tran. 1995. Scintigraphic Measurement of Uterine Clearance in Mares. Vet. Radiol. Ultrasound. 36:64-68.

57. Nie, G. J., K. E. Johnson, J. G. Wenzel, and T. D. Braden. 2003a. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. Theriogenology 60:1111-1118.

58. Nie, G. J., K. E. Johnson, J. G. Wenzel, and T. D. Braden. 2003b. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on day 0, 1 or 2 post-ovulation. Theriogenology 60:1119-1125.

59. Nikolakopoulos, E. and E. D. Watson. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. Theriogenology 52:413-423.

60. Ozgen, S., H. A. Schoon, H. Aupperle, H. Sieme, and E. Klug. Etiopathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. Pferdeheilkunde 18[6], 594-599. 2002.

61. Ref Type: Journal (Full)

62. Padilla, A. W. and R. H. Foote. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. J Anim Sci 69:3308-3313.

63. Pascoe, D. R., G. H. Stabenfeldt, J. P. Hughes, and H. Kindahl. 1989. Endogenous prostaglandin F-2alpha release induced by physiologic saline solution infusion in utero in the mare: Effect of temperature, osmolarity, and pH. American Journal Of Veterinary Research 50:1080-1083.

64. Pickett, B. W., E. L. Squires, and A. O. McKinnon. 1987. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artifical insemination. Animal Reproduction Labrotary, Colorado State University.

65. Pickett, B. W., J. J. Sullivan, W. W. Byers, M. M. Pace, and E. E. Remmenga. 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil. Steril. 26:167-174.

66. Platt, H. 1973. Aetiological aspects of abortion in the Thoroughbred mare. J. Comp. Pathol. 83:199-205.

67. Pope, A. M., D. L. Campbell, and J. P. Davidson. 1979. Endometrial histology and post-partum mares treated with progesterone and synthetic GnRH (AY-24,031). J Reprod Fertil. Suppl587-591.

68. Pycock, J. F. 1994. Assessment of Oxytocin and Intrauterine Antibiotics on Intrauterine Fluid and Pregnancy Rates in the Mare. Proc. AAEP 40:19-20.

69. Pycock, J. F. and J. R. Newcombe. 1996. Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. Vet Rec 138:320-323.

70. Rohrbach, B. W., P. C. Sheerin, C. K. Cantrell, P. M. Matthews, J. V. Steiner, and L. E. Dodds. 2007. Effect of adjunctive treatment with intravenously administered Propionibacterium acnes on reproductive performance in mares with persistent endometritis. J Am Vet Med Assoc 231:107-113.

71. Samper, J. C. 1997. Ultrasonograhic appearance and the pattern of uterine edema to time of ovulation in the mare. Proc AAEP 43:191.

72. Schilela, A., E. Malschitzky, A. L. Mattos, P. Garbade, R. M. Gregory, and R. C. Mattos. Effect of an intra-uterine fluid accumulation before and after the first postpartum ovulation on pregnancy rates in the mare. Pferdeheilkunde 17[6], 639-643. 2001.

73. Ref Type: Journal (Full)

74. Sexton, P. E. and F. M. Bristol. 1985. Uterine involution in mares treated with progesterone and estradiol-17beta. J. Am. Vet. Med. Assoc. 186:252-256.

75. Silva, M. I., E. F. Nascimento, and G. D. Cassali. 1995. Persistent Endometrial Cups in Mare - Case-Report. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 47:31-36.

76. Squires, E. L., C. K. Barnes, H. S. Rowley, A. O. McKinnon, B. W. Pickett, and R. K. Shideler. 1989. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. Proc. AAEP25-30.

77. Squires, E. L., C. P. Heesemann, S. K. Webel, R. K. Shideler, and J. L. Voss. 1983. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. J. Anim. Sci. 56:901-910.

78. Squires, E. L., A. O. McKinnon, E. M. Carnevale, R. Morris, and T. M. Nett. 1987. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. J Reprod Fertil. Suppl 35:399-403.

79. Stanton, M. B., J. V. Steiner, and D. G. Pugh. Endometrial cysts in the mare. J Equine Vet Sci 24[1], 14-19. 2004.

80. Ref Type: Journal (Full)

81. Steiner, J., D. F. Antczak, K. Wolfsdorf, K. Saville, S. Brooks, D. Miller, E. Bailey, and W. Zent. Persistent endometrial cups. Anim.Reprod.Sci. 94, 274-275. 2006.

82. Ref Type: Journal (Full)

83. Sullivan, J. J., P. C. Turner, L. C. Self, H. B. Gutteridge, and D. E. Bartlett. 1975. Survey of reproductive efficiency in the Quarter-horse and Thoroughbred. J Reprod Fertil. Suppl315-318.

84. Tannus, R. J. and R. Thun. 1995. Influence of Endometrial Cysts on Conception Rate of Mares. J. Vet. Med. A-Zbl. Vet. A-Physiol. 42:275-283.

85. Timoney, P. J., P. J. O'Reilly, A. M. Harrington, R. McCormack, and J. F. McArdle. 1979. Survival of Haemophilus equigenitalis in different antibiotic- containing semen extenders. J. Reprod. Fertil. Suppl.377-381.

86. Troedsson, M. T. 1997. Therapeutic Considerations for Mating-Induced Endometritis. Pferdeheilkunde. 13:516-520.

87. Vaillancourt, D., P. Guay, and R. Higgins. 1993. The effectiveness of gentamicin or polymyxin B for the control of bacterial growth in equine semen stored at 20 degrees C or 5 degrees C for up to forty-eight hours. Canadian Journal Of Veterinary Research 57:277-280.

88. Vanderwall, D. K. and G. L. Woods. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. J Amer Vet Med Assn 222[8], 1108-1110. 2003.

89. Ref Type: Journal (Full)

90. Watson, E. D., S. Barbacini, B. Berrocal, O. Sheerin, V. Marchi, G. Zavaglia, and D. Necchi. 2001. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. Theriogenology 56:123-131.

91. Willis, L. A. and W. T. Riddle. Theriogenology question of the month. J Am Vet Med Assoc 226[6], 877-879. 2005.

92. Ref Type: Journal (Full)

93. Winter, A. J. 1982. Microbial immunity in the reproductive tract. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181:1069-1073.

94. Woods, G. L., C. B. Baker, J. L. Baldwin, B. A. Ball, J. Bilinski, W. L. Cooper, W. B. Ley, E. C. Mank, and H. N. Erb. 1987. Early pregnancy loss in brood mares. J Reprod Fertil. Suppl 35:455-459.

Apartado II

Ginecología ♯ 1

LA ADMINISTRACIÓN DE hCG EN DIFERENTES MOMENTOS DEL DÍA AFECTA EL MOMENTO DE OVULACIÓN EN YEGUAS

Administration of hCG at different times of the day affects the interval to ovulation in mares

***Azcurra M*[1]; Mora M M [1,2]; Vlek J [1,3]; Olivera M [1,3]; Morete M [4,5]; de La Sota R L [1.]**

[1]Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, La Plata, BA; [2]Práctica Privada, Los Toldos, BA; [3]Práctica Privada, La Plata, BA; [4]Práctica Privada, Jeppener, BA; [5]Génitor Reproducción Equina, Cañuelas, BA. Miriam Azcurra, E-mail: azcurram@yahoo.com.ar *Cel: +54-9-221-4113638*

RESUME

The objective of this study was to do a retrospective analysis of the effect of hCG administration during different times of the day on the time of ovulation. Were included 163 cycles of 134 Silla Argentino regularly cycling mares with ages from 3 to 18 years during four breeding seasons (2004, 2005, 2011, 2012) (for this latitude that includes September - February) from different horse farms of the Province of Buenos Aires. All mares that were detected in heat and had ovarian follicles size measured by transrectal ultrasound. A dose of hCG (2000 IU; Ovusyn®, Syntex SA, Argentina; IV) was administered to mares when follicle diameter was ≥ 35 mm and endometrial folds and uterine edema (ecotexture) was grade 3. Starting 24 after hCG administration, mares were ultrasound every 6 h until ovulation was detected. Based upon the time of hCG administration, mares were assigned to one of four groups (morning [MOR, 03:01-09:00 h], midday [MID, 09:01-15:00 h], afternoon [AFT, 15:01-21:00 h], y night [NIG, 21:01-03:00 h]). Data were analyzed by ANOVA using PROC MIXED and PROC GENMOD of SAS. About 94.5% of mares ovulated within 24-48 h after hCG administration, and only 9 mares ovulated after 48 h of hCG administration. There was no effect of breading season (P<0.14) and no interaction of breeding season by group (P<0.70). Conversely, there were differences in the interval form hCG administration to ovulation (ITO) between groups (P<0.02). The ITO was longer in mares from the MID group compared to the mares of the MOR, AAFT and NIG groups (P<0.001). In addition, ITO was similar in the MOR, AAFT and NIG groups (P<0.58). In conclusion, administration of hCG in mares during the breeding season at the afternoon, night and early morning advanced ovulation by 2 h compared to mares that had hCG administered at midday.

INTRODUCCION

El uso de gonadotrofina coriónica humana (hCG) en el manejo reproductivo de la hembra equina es ampliamente conocido y utilizado para reducir el intervalo inicio del celo--ovulación. De esta manera se acorta la duración del estro y como consecuencia, el número de apareamientos requeridos en el servicio natural o, se incrementa notablemente la efectividad en la aplicación de biotecnologías de diversa complejidad como inseminación artificial y transferencia de embriones. En un trabajo realizado por Gastal y Henry (1991),

donde se compararon los intervalos de ovulación en yeguas control versus yeguas tratadas con hCG en diferentes momentos del día, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las ovulaciones durante la mañana, tarde y noche. Sin embargo, en un estudio más reciente realizado por Serres et al. (2010) ellos demostraron que la administración de la hCG a las 18:00 h induce ovulaciones significativamente más tempranas que las administradas a las 00:00 o 12:00 h. De lo anteriormente expuesto surge que en los trabajos previos no habría acuerdo sobre el efecto del momento de la administración de hCG durante diferentes momentos del día y el momento de la ovulación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar en forma retrospectiva el efecto de la administración de hCG en diferentes momentos del día sobre el momento de ovulación. Nuestra hipótesis de trabajo fue que la aplicación de hCG en diferentes momentos del día afectaría el intervalo tratamiento-ovulación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron los registros de 4 temporadas reproductivas (2004, 2005, 2011 y 2012), que incluyen 163 ciclos de 134 yeguas de raza Silla Argentino entre 3 y 18 años que estaban ciclando regularmente en diferentes haras de la provincia de Buenos Aires, Argentina. La administración de hCG (2000 UI; Ovusyn®, Syntex SA, Argentina; IV) se realizó a todas aquellas yeguas que presentaban signos de celo y que al momento de la evaluación mediante ultrasonografía transrectal (Pie Medical S100, Maastrich, Holanda; transductor de 5 MHz), presentaban diámetros foliculares mayores o iguales a 35 mm e imagen ecográfica uterina con pliegues endometriales evidentes (edema grado 3). A partir de las 24h de administración se realizó seguimiento ecográfico de las yeguas cada 6 h hasta que se evidenció la ovulación. Las yeguas fueron asignadas a 4 grupos según el horario de administración de la hCG (mañana [MAN, 03:01-09:00 h], mediodía [MED, 09:01-15:00 h], tarde [TAR, 15:01-21:00 h], y noche [NOC, 21:01-03:00 h]). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el PROC MIXED y GENMOD de SAS® 9.2 (SAS, 2007). El intervalo tratamiento ovulación (ITO), el diámetro del folículo preovulatorio (DIAMF) y el edema uterino (EDEMAU) fueron analizados con el modelo matemático que incluyo los términos de grupo (MAN, MED, TAR, NOC), temporada (2004, 2005, 2011, 2012), y la interacción de grupo por temporada. Las diferencias entre medias para los grupos fueron analizadas mediante contrastes ortogonales. Un nivel de $P<0.05$ fue considerado significativo, y un nivel de $P>0.05$ y $P<0.10$ fue considerado una tendencia a ser significativo.

RESULTADOS

La ovulación ocurrió entre las 24 y 48 h posteriores a la administración de la hCG en el 94.5% (154/163) de los casos. Solo 9 yeguas ovularon después de las 48 h de la administración de hCG. Para el ITO, no se detectó un efecto de temporada reproductiva ($P<0.14$) ni una interacción de grupo por temporada ($P<0.70$). Por el contrario, si se detectaron diferencias en el ITO entre los grupos ($P<0.02$). El ITO fue mayor en las yeguas del grupo MED que en las yeguas de los grupos MAN, TAR, y NOC (41.02±0.69 vs. 38.00±1.06 h, $P<0.001$; Tabla1). Además, el ITO fue similar entre las yeguas de los grupos MAN, TAR, y NOC ($P<0.58$). El DIAMF fue menor en las yeguas del grupo MAN que en los grupos MED, TAR y NOC 34.41±1,07 vs. 38.94±1.02 mm, $P<0.001$; Tabla 1). También, el DIAMF fue similar entre los grupos MED, TAR, y NOC ($P<0.17$).Las yeguas del grupo MAN tendieron a tener un mayor EDEMAU que en las yeguas de los grupos MED, TAR y NOC (3.62±0.12 vs. 3.36±0.12 grado de edema, $P<0.07$; Tabla 1). Además, las yeguas del grupo TAR y NOC tendieron a tener un mayor EDEMAU que en las yeguas de los grupos MED (3.42±0.12 vs. 3.24±0.11 grado de edema, $P<0.07$; Tabla 1).

Tabla 1. Cuadrado medio mínimo y error estándar del intervalo tratamiento-ovulación (ITO), diámetro del folículo preovulatorio (DIAMF) y grado del edema uterino (EDEMAU) en yeguas tratados con hCG para inducir la ovulación.

	n	ITO (h)	D F (mm)	ED (grado)
Mañana (MAN)	36	38.63±0.96^{B}	34.41±1.07^{A}	3.62±0.12^{C}
Mediodía (MED)	70	41.02±0.69^{A}	39.00±0.97^{B}	3.24±0.11^{E}
Tarde (TAR)	20	38.37±0.95^{B}	38.77±0.94^{B}	3.45±0.11^{D}
Noche (NOC)	37	37.01±1.29^{B}	39.05±1.17^{B}	3.40±0.14^{D}

Superíndices A y B en una misma columna difieren a P<0.05; Superíndices C, D y E en una misma columna difieren a P<0.07. (DF)= diámetro folicular; (ED)= edema endometrial

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestra hipótesis planteada, la aplicación de hCG en horas de la tarde, de la noche y de la mañana (15:01-09:00 h)adelantó el momento de ovulación 2 h con respecto a la aplicación de la hCG al mediodía (09:00-15:00 h). Nuestros resultados concuerdan con los resultados reportados por Serres et al. (2010) en donde un mayor número de yeguas tienden a ovular durante el periodo comprendido entre las 22:00 y las 06:00 h. Tal vez, el hecho de haber incluido un mayor número de yeguas en nuestro estudio (n=134) nos permitió encontrar diferencias significativas en el intervalo tratamiento ovulación que en estudios previos (Serres et al., 2010; n=48). Estos resultados refuerzan el concepto de que la administración de hCG no suprime en forma completa el patrón horario de ovulación en la yegua.

CONCLUSIONES

En este estudio, la aplicación de 2000 UI de hCG en la tarde, noche y mañana adelanta 2 h el momento de ovulación comparado con la aplicación de hCG al mediodía en yeguas durante la estación reproductiva.

REFERENCIAS

Brandecamp EA; Snyder A; Rocha A; LyleSR; Len j; Eilts BE; Godke RA; Paccamonti DL. 2008. Can time of day of ovulation be influenced by hCG? In: Proceedings of the 5th Int. Conf. Equine Reprod. Med., Leipzig, 24-25 November 2007. p. 112.

Gastal EL; Henry M. 1991. Ovulatory response, distribution of ovulation in 24 h period and embryonic recovery rates in mares treated with hCG. Rev. Bras. Reprod. Anim. 15:171-178.

Serres C; Gómez-Cuétara L; Gutiérrez-Cepeda L; Redondo M. 2010. Effect of hCG administration at different times of the day on the interval to ovulation in mares.Anim. Reprod. Sci. 121S:S74--S75.

DOPPLER ULTRASONOGRAPHY EVALUATION OF VASCULARITY IN THE WALL OF PREOVULATORY FOLLICLES IN MARES TREATED WITH DESLORELIN: PRELIMINARY RESULTS

Evaluacion por ultrasonografia Doppler de la vascularidad en la pared de foliculos preovulatorios en yeguas tratadas con deslorelina: resultados preliminares

Boakari YL*[1]*; Ferreira JC; Canesin HS; Meira C.

[1] *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Botucatu, SP, Brasil, Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970 *phone: 55 86 9982-9107; e-mail: yattlb@yahoo.com*

RESUMEN

De acuerdo a reportes previos, la ultrasonografia Doppler color puede ser utilizada para evaluar los cambios de los folículos preovulatorios en yeguas y predecir la ovulación. De todos modos no existen reportes respecto a los efectos específicos de los agonistas de GnRH sobre la vascularidad folicular en las yeguas. Un total de 7 yeguas fueron tratadas con acetato de deslorelina en presencia de un folículo ≥35mm (H0). Los folículos fueron escaneados con el sistema Power Doppler cada 6 horas desde H0 hasta H36 y durante las 6 horas previas a la ovulación para evaluar la dinámica del folículo preovulatorio. La ovulación ocurrió en promedio 39.85 ± 2.03 horas post inyección de deslorelina. No fue detectado un efecto temporal (P>0.1) en la perfusión vascular folicular durante las primeras 36 horas post-tratamiento o durante las 6 horas previas a la ovulación, de todos modos una leve disminución de la perfusión vascular fue detectada durante las últimas 5 horas previas a la ovulación. Basado en los resultados obtenidos al momento, no ha sido posible determinar la influencia de la deslorelina en la perfusión vascular en las yeguas.

INTRODUCTION

Currently in equine reproduction the use of ovulation inducing agents is very common to hasten ovulation. Therefore, veterinarians are able to predict more precisely the moment of ovulation and consequently the time to inseminate mares, improving breeding efficacy (Squires, 2008). GnRH agonist (deslorelin acetate) is an ovulation inducing agent which stimulates the release of endogenous LH and FSH from the anterior pituitary (Stich, 2004). With the use of Doppler ultrasonography it is possible to evaluate the vascularization of the reproductive tract of large animals. Representing the direction and velocity of red blood cells in the form of Doppler color points of different intensities (Ferreira and Meira, 2011), this technology allows identification of blood flow present in the wall of follicles in a precise and real time manner (Ginther et al., 2008). According to Gastal et al. (2006), the preovulatory follicle of mares, treated or not with hCG, showed a progressive increase in

vascularity during the first 30 hours after treatment with no difference between groups. Additionally, an abrupt decrease in follicular blood flow during the last four hours prior to ovulation was reported. Considering the limited number of studies regarding preovulatory follicle he modynamics of mares treated with ovulatory inducing agents, this study aimed to evaluate vascularity in the follicle wall using Doppler ultrasonography in mares treated with deslorelin acetate.

MATERIALS AND METHODS

The present study was done at Equine Reproduction Center (CERBEQ) of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, UNESP, Brazil. Mares were maintained on Coast-Cross (*Cynodondactylon*) hay, commercial feed, and had free access to water and mineral salt. A total of seven mares were used in this study. B-mode ultrasound exam of the reproductive tract was done every day for ovarian dynamic monitoring. Mares with haemorrhagic anovulatory follicles and septated or multiple ovulations were not used in the statistical analyses. When a preovulatory follicle ≥35 mm of diameter and endometrial edema were detected the mares were treated with 1.5 mg of a deslorelin acetate administered intramuscularly (H0) according to McCue et al. (2007). Immediately prior to treatment mares were evaluated with Power-Doppler ultrasonography exam to determine the vascular perfusion of the preovulatory follicle. Successive ultrasound exams were performed every six hours from H0 to H36. Additionally, Doppler exam was done every hour from H30 until ovulation. Color Doppler ultrasound instrument (SONOACE PICO, Medison do Brasil Ltda) equipped with alinear-array transducer (LV5-9CDn, 60nn) was used to evaluate follicular hemodynamics. Power-flow Doppler evaluation of the preovulatory follicle was done as previously described by Romano et al. (2012). The follicle was scanned slowly in lateral movements in an attempt to capture in the best possible manner the accurate vascularity of the follicle wall. All exams videos were captured and stored in a laptop for posterior analysis in the laboratory. A subjective analysis was done, considering the percentage (0 to 100%) of the follicular wall with Doppler color signals. Statistical analysis of data was divided in two distinct moments: 1) through the first 36 hours post-treatment (from H0 to H36), and 2) during the six hours prior to ovulation (between H-6 to OV). Analysis of variance for repeated measures was used for statistical analysis. A probability of $P \leq 0.05$ was used to indicate significance.

RESULTS

Ovulation was detected 39.85 ± 2.03 hours post-treatment with deslorelin. The preovulatory follicle vascular perfusion did not differ statistically ($P > 0.1$) during the first 36 hours post-treatment and during the last six hours prior to ovulation. However, a subtle decrease in vascular perfusion was detected during the last five hours before ovulation (Figure 1).

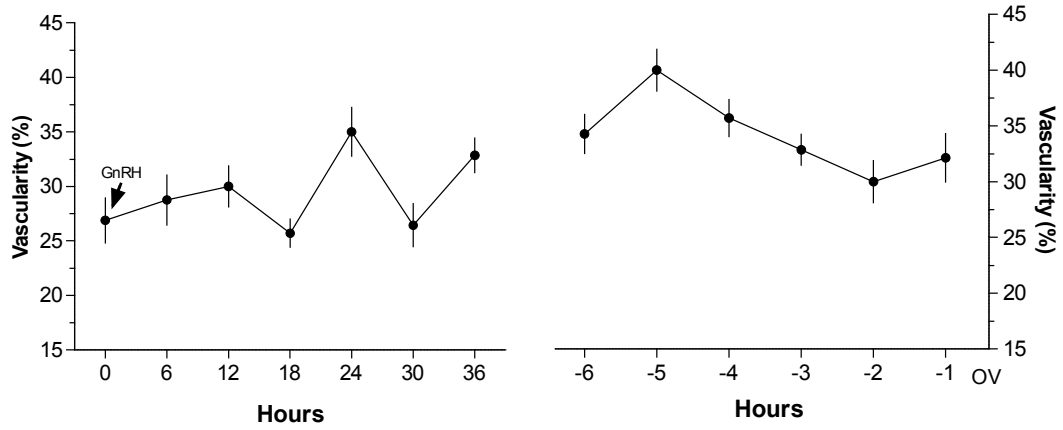


Figure 1: Mean ± S.E.M. vascular perfusion (%) of preovulatory follicle during the first 36 hours post-treatment with deslorelin and during the 6 hours prior to ovulation (OV). No difference between moments was noted (P>0.05).

DISCUSSION

This is the first description of follicular hemodynamics during the last hours before ovulation in mares treated with deslorelin. The absence of change on follicle vascular perfusion from H0 to H36 does not support previous report, which found a progressive increase of follicular vascular perfusion during the first 36 hours after hCG treatment (Gastal et al., 2006). The slight decrease in follicular vascular perfusion observed during the last five hours before ovulation, was not as evident as stated by Gastal et al. during the last four hours before ovulation (2006). Different hormonal treatments (hCG or GnRH) used might be involved with the minor differences in results, therefore reasons for dissimilarities need to be elucidated.

CONCLUSION

Based on the results obtained at this moment it was not possible to determine influence of deslorelin in preovulatory follicle vascular perfusion of mares.

SOURCES OF FUNDING: This research was supported by FAPESP, Brazil.

REFERENCES

Ferreira, JC; Meira, C.,2011. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos.Ciência Rural.41, 1063-1069.

Gastal, EL, Gastal, MO; Ginther, O.J.,2006. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. Reproduction.131, 699–709.

Ginther, OJ; Rodrigues, BL; Ferreira, JC; Araujo, RR; Beg, MA.,2008. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. Repro.Fert.Develop., 20, 684-693.

McCue, PM; Magee, C; Gee, EK., 2007. Comparison of compounded deslorelin and hcg for induction of ovulation in mares, Journal of Equine Vet. Sci., 27-2, 58-61.

Romano, RM; Ferreira, JC; Canesin, HS;Ignácio, FI; Novaes Filho, LF; Meira, C., 2012.Luteal vascular perfusion and plasma progesterone concentration are not affected by the vascularity of preovulatory follicle. *In: Proceedings* of 8th International Symposium on Equine Embryo Transfer.

Squires, EL., 2008.Hormonal manipulation of the mare: a review, Journal of Equine Veterinary Science, 28, 627-634.

Stich, KL; Wendt, KM; Blanchard, TL; Brinsko, SP., 2004. Effects of a new injectable short-term release deslorelin in foal-heat mares, Theriogenology, 62, 831–836.

FATORES AMBIENTAIS QUE AFETAM O TEMPO DE GESTAÇÃO EM ÉGUAS PURO SANGUE INGLÊS - DADOS PRELIMINARES.

Factores ambientales que afectan el tiempo gestacional en yeguas Pura Sangre Ingles. Resultados preliminares

Environmental factors affecting gestation length in thoroughbred mares. Preliminary data

Bueno V [1]***; Saraiva NM*** [2]***; Haetinguer C*** [3]***; Curcio B*** [4]***; Nogueira CEW*** [5]

[1]veronicalacruzbueno@hotmail.com, *(51) 98396594, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Departamento de Clinicas Veterinária. Campus Capão do Leão- 96100-000 Capão do Leão, RS- Brasil.*[2] natane_saraiva@yahoo.com, Cloue_haet@hotmail.com ,[4]curciobruna@hotmail.com,[5]cewn@terra.com.

RESUME

The gestation length is a physiological variable with clinical and economic importance in the equine species, because the management of high-value horses requires a precise knowledge of parturition, reducing the risk to the mare and foal in this critical phase. The aim of this study is to evaluate the correlation between gestational length and the climatic factors rainfall, temperature and humidity during the gestational period of Thoroughbred mares. Data from 722 pregnancies were collected over nine breeding seasons in horse farms located in different states of Brazil: Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo. Statistical analysis included descriptive statistics, Tukey test and Pearson correlation. The average temperature during pregnancy was 16.9±3.8°C, rainfall was 112±96.9mm and relative humidity was 72.15%. The mean length of gestation was 345.5 days in the RS, 338.4 days in PR and 337.1 days in SP. The gestation length of Thoroughbred mares is higher in regions with lower average temperatures, lower in regions with higher humidity and not influenced in comparison with rainfall.

INTRODUÇÃO

O tempo de gestação é uma variável fisiológica de importância econômica e clínica na espécie equina, pois o manejo de cavalos de alto valor demanda um conhecimento preciso do momento do parto, reduzindo os riscos para a égua e para potro nessa fase crítica (Silver, 1990). Este estudo tem como objetivo avaliar a correlação entre os fatores climáticos: precipitação pluviométrica, temperatura e umidade durante o período gestacional e relacionar esses fatores com o tempo de gestação (TG) em éguas da raça Puro Sangue

Inglês (PSI) em diferentes estados do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em haras de criação de equinos PSI no Brasil, nos estados Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e São Paulo (SP). Foram coletadas informações de 722 gestações de éguas PSI com idades entre 4 e 18 anos, primíparas e multiparas. Referentes as temporadas reprodutivas de 2001 à 2009, realizadas nos meses de julho a dezembro de cada ano (padreações agosto à dezembro e os partos de julho à novembro).Foram avaliadas as médias mensais das variáveis climáticas precipitação pluviométrica, temperatura e umidade locais nos períodos de gestação das éguas e realizada correlação com o TG. Foram consideradas somente gestações com partos eutócicos e com neonatos viáveis. Os fatores climáticos, foram obtidos no Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas de Pelotas, Instituto Nacional de Meteorologia 8º DISME e Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Centro de Análise e Planejamento da UNESP/Rio Claro. Foi realizada estatística descritiva, teste de Tukey para comparação entre médias e teste de correlação de Pearson entre as variáveis climáticas e o TG (Programa Statistix 9.0®). Foi considerado nível de significância de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

A precipitação pluviométrica apresentou diferença ($p<0.001$) entre todos os estados, com valores mais elevados no RS (Figura 1). A temperatura (Figura 2) apresentou valores mais elevados no estado de SP ($p<0.001$). A umidade demostrou diferença estatística ($p<0.001$) entre todos os estados, com valores maiores no PR (Figura 3). O tempo de gestação (Figura 4) foi superior no estado do RS em relação aos demais estados ($p<0.001$). Na avaliação da interação entre as variáveis ambientais com o TG as variáveis temperatura e umidade influenciaram significativamente ($p<0.001$) o tempo de gestação. O fator precipitação não apresentou correlação com o TG ($p=0.09$).

Figura 1: Gráfico demonstrando a média da precipitação pluviométrica nos diferentes estados.

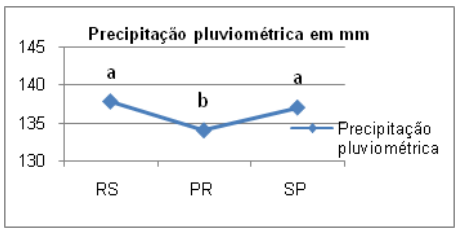
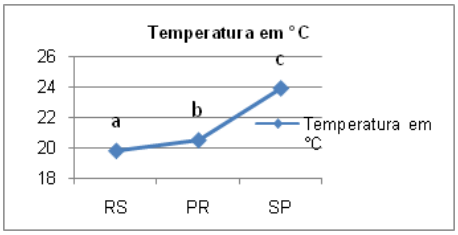


Figura 2: Gráfico demonstrando a média da temperatura nos diferentes estados.



Letras diferentes representam diferença significativa entre as média ($p<0.001$).

Figura 3: Gráfico demonstrando a média médio da umidade nos diferentes estados.

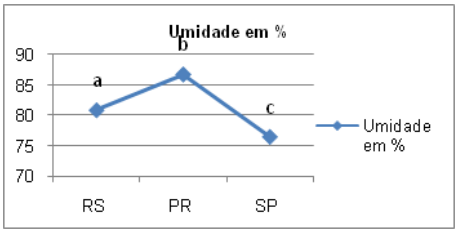
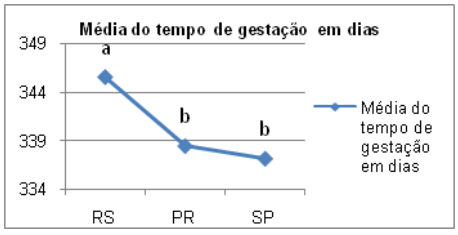


Figura 4: Gráfico demonstrando o tempo de gestação nos diferentes estados.



Letras diferentes representam diferença significativa entre s médias ($P<0.001$).

DISCUSSÃO

O TG fisiológico em éguas é de 320 a 360 dias, sendo que estes valores variam de acordo com a raça e a população equina avaliada (Silver, 1990) entre outros fatores. Os tempos de gestações encontrados no presente trabalho são semelhantes aos descritos na literatura (Valera et al., 2005), sendo que estes autores sugerem que a duração da gestação é influenciada tanto por fatores genéticos como ambientais. Uma série de estudos confirmaram essas variações na duração da gestação em diversas raças de cavalos (P›erez et al., 2003). O fotoperíodo é uma importante fonte de variação do período de gestação assim como a temperatura, pois os dias são mais longos nas estações mais quentes. A temperatura externa é um dos fatores que pode influênciar o efeito sinalizador do fotoperíodo (Nagy et al., 2000). Em períodos de maior fotoperíodo é observado um menor tempo de gestação, segundo Valera et al. (2005). Durante o pastejo os animais ingerem de 30 a 50 bocadas por minuto. Em períodos chuvosos este valor diminui para 42 bocadas por minuto (Silva et al., 2004). Desta forma, durante períodos com menor luminosidade e maior precipitação pluviométrica a égua consome menor quantidade de alimento. Segundo Valera et al. (2005) a fisiologia das éguas tende a direcionar a realização dos partos para os períodos climáticos mais amenos, ou seja, o início da primavera, através de gestações mais curtas ou mais longas. Com o aumento da temperatura e a umidade ideal para desenvolvimento das pastagens há um aumento no valor nutricional de pastagens e, como resultado, a égua pode ter uma maior ingestão nutricional e o potro leva menos tempo para atingir o peso adequado para o nascimento (Valera et al., 2005).

CONCLUSÃO

A temperatura ambiental apresentou influência sobre o período gestacional em éguas PSI, sendo que em regiões com menores temperaturas foi constatado maior tempo gestacional e a medida que a umidade aumenta o TG é maior. A precipitação pluviométrica não apresentou influência significativa sobre o tempo gestacional.

AGRADECIMENTOS: Aos órgãos e institutos que cederam os dados referentes às variáveis climáticas. Aos responsáveis dos criatórios pelo fornecimento dos dados. E as fundações CAPES e CPNQ.

REFERÊNCIAS

Almeida, F.Q.; Brito, C.O.; Lana, A.M.Q.; Lopes, B.A.; Duque, R.S.; Corassa, A. Soares Neto, J. 2001 Ingestive behaveur in grazing mares. In: Symposyum Equine Utrition and Physiology,17.,2001, Lexangton: ENPS, p. 479-483.

M. Valera; F. Blesa; R. Dos Santos; A. Molina.2005. Genetic study of gestation length in andalusian and arabian mares. Reproduction Science, Elsevier, 75-96.

Perez, C.; Rodrıguez, J.; Mota, J.; Dorado, M.; Hidalgo, M.; Felipe, J.; Sanz, G. 2003. Gestation length in Carthusian Spanishbred mares.

Nagy, P.; Guillaume, D.; Daels, P. 2000: Seasonality in mares. Animal Reproduction Science, 60-61.

Silva, L.A.C.; Santos, S.A.; Pellegrin, L.A.; Costa, A.C.O.; Petzold, H.V. 2004. Comportamento de pastejo e preferência alimentar de cavalos pantaneiros usados no manejo diário do gado do pantanal. Reunião anual da sociedade brasileira de Zootecnia, Anais, MS.

Silver, M. 1990.Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in 355 domestic animals.Exp. Physiol. v.75, n.3, p.285–307.

Ginecología ♯ 4

PERFUSÃO VASCULAR UTERINA DURANTE O PERÍODO LUTEOLÍTICO EM ÉGUAS

Perfusion vascular uterina durante el periodo luteolitico en yeguas

Uterine vascular perfusion during the luteolytic phase in mares

***Canesin HS*[1*]; Ignácio FS[1]; Ferreira JC[1]; Romano RM[1]; Pantoja JCF[2]; Boakari YI[1]; Meira C[1].**

*[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. *E-mail:* heloisasiqueirac@hotmail.com, *Telefone/fax: +55 14 3880-2119. [2] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.*

RESUMEN

La ultrasonografia Doppler es una herramienta reciente en reproducción equina que permite una evaluación no invasiva de la perfusión vascular. En yeguas, la hemodinámica uterina está directamente relacionada con el estado del ciclo estral. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la hemodinámica uterina durante el periodo luteolitico en yeguas. La perfusión vascular luteal (PVL), objetiva (índices Doppler de resistencia y pulsatilidad-RI y PI) y perfusión vascular subjetiva (PVU) fue evaluada en nueve yeguas diariamente durante el ciclo estral. A lo largo de los días, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (P>0.05) para las variables PVU, RI y PI. De todos modos hubo diferencia significativa (P<0.05) para PVL. Fue observada una alta correlación de PVL y PVU (R^2 = 0.92) y con PI (R^2 = 0.82). La disminución constante de PVL a lo largo del periodo luteolitico es coincidente con reportes previos (Bollwein et al., 2002; Ginther et al., 2007). El perfil de PVU durante los días de observación se corrobora con datos previamente obtenidos de la arteria uterina durante el ciclo estral (Bollwein et al., 2002). Hay una disminución de la perfusión vascular lútea durante todo el período luteolítico en yeguas, que muestra una alta correlación con el aumento de la perfusión vascular uterina.

RESUME

Doppler sonography is a recent tool in equine reproduction which allows noninvasive evaluation of vascular perfusion. In mares, uterine hemodynamics is directly related to estrous cycle stage. The aim of the present study was to characterize uterus hemodynamics during the luteolytic period. Luteal vascular perfusion (PVL), objective (Doppler indices of resistance and pulsatility – RI and PI) and subjective uterine vascular perfusion (PVU) were evaluated in nine mares daily during the estrous cycle. Throughout the days, no statistical difference was found (P>0.05) for the variables PVU, RI and PI, however there was a significant (P<0.05) difference for PVL. A high correlation of PVL and PVU (R^2 = 0.92) and with PI (R^2 = 0.82) was observed. The constant decrease of PVL throughout the luteolytic period coincided previous results (Bollwein et al., 2002; Ginther et al.,

2007). Profile of PVU during the observed days corroborate with previous findings of data collected from the uterine artery during the estrous cycle (Bollwein et al., 2002). There is a decrease in luteal vascular perfusion throughout luteolytic period in mares, showing a high correlation with increased uterine vascular perfusion.

INTRODUÇÃO

Na reprodução equina, o exame do trato reprodutivo é imprescindível para avaliação de matrizes e seleção de éguas receptoras de embrião, e o útero necessita de especial atenção neste processo. Atualmente, o exame complementar mais utilizado é a ultrassonografia modo B. Nas últimas décadas, iniciaram-se os estudos na reprodução equina de uma nova ferramenta capaz de avaliar tecidos e órgãos: a ultrassonografia modo Doppler, que analisa a perfusão vascular de forma não invasiva e em tempo real. Por ser uma técnica de aplicação recente, a ausência da determinação de padrões da perfusão vascular do útero em processos fisiológicos é um dos principais fatores limitantes do estudo e utilização desta técnica a campo, merecendo enfoque nos trabalhos atuais. Em éguas, assim como em outras espécies, o útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, sendo o estágio deste diretamente relacionado à perfusão vascular uterina (Bollwein et al., 1998; Bollwein et al., 2002b). Estas alterações são reguladas pelos hormônios esteroidais (estrógeno e progesterona) e por uma rede de complexas interações entre fatores de crescimento locais, secretados pelo epitélio e estroma uterinos (Roman-Ponceet al., 1983; Bollwein et al., 2002b; Sagsoz e Saruhan, 2011). Durante o diestro, a irrigação uterina não foi correlacionada à concentrações plasmáticas de progesterona em éguas, no entanto, ao longo do estro, se mostrou diretamente relacionada ao perfil estrogênico (Bollwein et al., 2002b). O objetivo do presente estudo foi avaliar a hemodinâmica uterina no período luteolítico, por meio da avaliação ultrassonográfica modo Doppler em vasos presentes no mesométrio, miométrio e endométrio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas nove éguas não gestantes, mestiças, com idade entre quatro e 15 anos e em bom estado corporal. Os animais foram alimentados com feno de Cost-Cross (*Cynodon dactylon*), ração concentrada, suplemento mineral e acesso livre à água. Exames citológicos e histológicos do útero foram previamente realizados para exclusão de animais com alterações inflamatórias e degenerativas. As éguas foram acompanhadas diariamente para detecção da ovulação espontânea, por meio de ultrassonografia modo-B. Após a ovulação, analisou-se diariamente a irrigação do útero e do corpo lúteo (CL). A perfusão vascular luteal (PVL) foi avaliada até o momento em que não houvesse presença de irrigação no tecido luteínico, por meio de ultrassonografia Doppler modo Power-Flow. A PVL foi estimada subjetivamente e em tempo real por meio da porcentagem (0 a 100%) de tecido luteínico com sinais Doppler coloridos. Quando houve uma redução maior que 50% no número de sinais coloridos sobre o tecido luteal, foi considerado o dia da luteólise (dia 0), como descrito por Araujo et al. (2009). Para avaliação da irrigação uterina analisou-se subjetiva e objetivamente o útero. A avaliação da perfusão vascular uterina subjetiva (PVU) foi realizada levando-se em consideração o número e a intensidade dos pontos coloridos Doppler presentes no mesométrio, miométrio e endométrio. Utilizou-se o exame ultrassonográfico Doppler modo Power-flow, em um escaneamento contínuo em tempo real de 1min, em corte transversal dos cornos uterinos (adaptado de Ferreira et al., 2008). A PVU foi classificada em um escore de 1 a 4 (mínima e máxima vascularidade, respectivamente). Para a análise objetiva os dados foram coletados das artérias de pequeno calibre presentes no me-

sométrio, no modo espectral Doppler (Silva et al., 2005). Para tanto, posicionou-se o cursor em uma artéria, um gráfico espectral com no mínimo três ciclos cardíacos semelhantes foi produzido para obtenção dos valores Índices de Resistência (RI) e de Pulsatilidade (PI). Este procedimento foi repetido três vezes em cada corno uterino, e a média dos valores foi utilizada. Para análise estatística, foram utilizados os dados de perfusão vascular uterina e luteal de dois dias antes até dois dias após a detecção da luteólise. Analisou-se, inicialmente, a distribuição das varáveis resposta. A variável PVU foi transformada para a escala log para análise, objetivando a normalização dos dados. Modelos lineares de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram utilizados para comparar as médias de cada variável resposta (PVL, PVU, RI e PI) entre os dias. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

RESULTADOS

A luteólise ocorreu, em média, no dia 14 do ciclo estral. Não foram encontradas diferenças estatísticas (P>0,05) para as variáveis PVU, RI e PI entre os dias D-2 e D2 (D0= dia da luteólise), enquanto para PVL houve diferença estatística no mesmo período (P<0,05; Tabela 1).

Tabela 1. Média ±SEM da perfusão vascular luteal (PVL), uterina (PVU) e índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) das artérias mesometriais de éguas entre os dias -2 e 2, considerando D0 o dia da luteólise.

Dias	PVL (%)	PVU (1-4)	RI	PI
-2	55,83±4,02[a]	1,72±0,11	0,65± 0,02	1,23±0,06
-1	45,31±2,24b	1,75±0,13	0,63±0,02	1,13±0,09
0	33,13±2,83c	2,07±0,18	0,60±0,03	1,08±0,11
1	20,83±2,27df	2,28±0,25	0,62±0,04	1,08±0,09
2	15,71±3,17ef	2,21±0,15	0,60±0,03	1,05±0,09

[a,b] Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P<0,05).

Quando correlacionadas as variáveis resposta, foi encontrada uma alta correlação da PVL com a PVU (R^2 = 0,92) e com o PI (R^2 = 0,82). No entanto, a correlação entre PVL e RI foi baixa (R^2 = 0,66).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a descrever a hemodinâmica uterina durante o período luteolítico em éguas, por meio da análise de vasos locais, e sua correlação com a perfusão vascular luteal. A diminuição progressiva da PVL ao longo do período luteolítico coincidiu com resultados anteriores obtidos, a partir da avaliação subjetiva (Ginther et al., 2007) e objetiva (Bollwein et al., 2002a) da perfusão vascular luteal. O perfil encontrado da perfusão vascular uterina no período luteolítico, tanto na avaliação subjetiva (PVU), quanto na objetiva (RI e PI), se assemelhou aos dados anteriormente descritos por Bollwein et al. (2002b), onde se analisou os dados coletados na artéria uterina. No entanto, neste último não foi estudada a correlação à PVL. A não detecção de diferença estatística para PVU, RI e

PI pode ser devido ao pequeno número de animais, adicionado às alterações nas variáveis resposta serem discretas.

CONCLUSÃO

Há uma diminuição evidente da perfusão vascular luteal ao longo do período luteolitico em éguas, que apresenta uma alta correlação ao aumento da perfusão vascular uterina.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

Araujo RR; Ginther OJ; Ferreira JC; Palhão MM; Beg MA; Wiltbank MC., 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. Biol. Reprod. 81, 426-437.

Bollwein H; Maierl R; Stolla R., 1998. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. Theriogenology. 49, 1483-1488.

Bollwein H; Mayer R; Weber R; Stolla R., 2002a. Luteal Blood Flow in mares. Theriogenology. 65, 2043-2051.

Bollwein H; Weber F; Kolberg B; Stolla R, 2002b. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. Theriogenology. 65, 2129-2138.

Ferreira JC; Gastal EL; Ginther OJ., 2008. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. Reprod. 135, 541-50.

Ginther OJ; Gastal EL; Gastal MO; Utt MD; Beg MA., 2007. Luteal blood flow and progesterone production in mares. An. Reprod. Sci. 99, 213–220.

Roman-Ponce H; Caton D; Thatcher WW; Lehrer R., 1983. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. Am. J. Physiol. 245, 843-849.

Sagˇ Söz BG; Saruhan H., 2011. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids. Theriogenology. 75, 1720–1734.

Silva LA; Gastal EL; Beg M; Ginther OJ., 2005. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. Biol. Reprod. 72, 755–761.

COMPONENTES DO LEITE DE ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA

Composicion de la leche de yeguas de raza Criolla

Milk components from Criollo breed mares

Costa GV*[1]*; Alves LP*[3]*; Bondan C*[3]*; Fiala Rechsteiner S*[2]*.

[1]Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos – UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil - gabi_vet@yahoo.com.br*[2] Professor do Curso de Medicina Veterinária – UPF – Passo Fundo, RS, Brasil [3]HISTOREP – Departamento de Morfologia – IB/UFPel – Pelotas, RS, Brasil*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los componentes de la leche de yeguas Criollas. Fueron utilizadas 12 yeguas pertenecientes a un haras ubicado en el sur de Brasil (RS). Las muestras de leche fueron tomadas de cada yegua cada dos semanas hasta los 180 días de lactancia. Las características analizadas fueron: grasa, proteína, lactosa y sólidos totales. El promedio de los compuestos de la leche fue de 0,57% de grasa, 1,95% de proteína, 6,71% de lactosa y 9,24% de sólidos totales. La etapa de lactancia y características individuales fueron los factores que influyeron en la composición de la leche.

RESUME

The aim of this study was to evaluate the compounds of milk of Criollo mares. A total of 12 mares belonging to a farm located in Southern Brazil (RS) were used. Milk samples were taken from each mare every two weeks up to 180 days of lactation. The characteristics analyzed were fat, protein, lactose and total solids. The average of milk compounds was 0.57% fat, 1.95% protein, 6.71% lactose and 9.24%total solids. Stage of lactation and individual characteristics influenced the amount of milk compounds.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos, principalmente durante os primeiros meses de vida (Holmes et al., 1947; Malacarne et al., 2002; Pikul e Wójtowski, 2008). Nos equinos, além do papel na imunidade dos recém-nascidos, as secreções mamárias da égua são fonte de nutrientes, vitaminas, enzimas, hormônios e fatores tróficos responsáveis pelo rápido crescimento dos potros nos primeiros meses de vida (Salimei e Fantuz, 2012). Para melhor entendimento das necessidades nutricionais das éguas e seus potros, é essencial o conhecimento da produção e composição do leite das éguas (Oftedal et al., 1983). O cavalo Crioulo está em elevado crescimento, com vendas passando de R$ 9 milhões em 1999 para R$ 90 milhões em 2009. Na Expointer de 2010, houve a participação de 900 animais, consolidan-

do a raça como um dos principais movimentos culturais e de mercado do agronegócio brasileiro (ABCCC, 2011).Levando-se em consideração a importância de suprir as necessidades nutricionais dos potros durante as primeiras semanas de vida para seu bom desenvolvimento, bem como a inexistência de publicação sobre o tema na raça Crioula, desenvolvemos este trabalho para estudar principais componentes do leite de éguas Crioulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante uma temporada reprodutiva, foram ordenhadas 12 éguas da raça Crioula, com idade média de 8.1 anos e peso médio de 441 kg. Amostras de leite foram coletadas de cada égua quinzenalmente durante 180 dias, sendo a 1ª coleta realizada até 15 dias após o parto. Os potros eram apartados das éguas 2 horas antes das coletas.Antes das coletas era realizada a higienização das mãos do ordenhador e dos tetos das éguas. Os primeiros jatos de leite foram desprezados e o restante coletado em recipiente onde foi realizada a homogeneização. As amostras foram obtidas dos dois tetos e a ordenha de cada teto foi completa. Após a homogeneização as amostras eram transferidas para um frasco esterilizado com capacidade para 45ml, contendo 0,1ml de azidiol para 30ml de leite.As amostras devidamente identificadas foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas para o Laboratório de Serviços de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo (UPF) em Passo Fundo, RS, Brasil, onde foram analisados os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.A analise estatística foi realizado utilizando estatística descritiva, distribuição de freqüência e analise de variância. A comparação das medias foi realizada a través do teste de diferença mínima significativa (DMS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os principais componentes do leite: gordura, proteína, lactose e sólidos totais. A composição e produção do leite podem ser influenciadas por fatores como idade, raça, paridade, peso da égua, estágio de lactação, condições ambientais e alimentares, características individuais e doenças da glândula mamária (Reis et al., 2007; Medhammar et al., 2012).A gordura é o componente que mais sofre mudanças, sendo 10 a 20 vezes maior no final do que no início da ordenha (Csapó et al., 1995; Salamón et al., 2009). O teor de gordura no leite das éguas é baixo quando comparado ao leite bovino (Csapó et al., 1995; Pikul & Wójtowski, 2008; Pietrzak-Fiećko et al., 2009; Salamón et al., 2009). Neste estudo a média deste componente foi de 0.57%. Houve variação na quantidade de gordura no decorrer da lactação (P=0.001). Medhammar et al. (2012) cita que o estágio de lactação é o fator que mais influencia a variação dos componentes do leite, principalmente o teor de gordura. Também se devem considerar características individuais, pois verificou-se que algumas éguas apresentaram teor de gordura mais alto que de outras éguas durante todo o período de lactação (Csapó et al., 1995).A média de teor de proteína encontrada neste estudo foi de 1.95%, sendo semelhante às médias obtidas por Schryver et al. (1986) Medhammar et al. (2012) Neste estudo observou-se diferença no valor da proteína entre éguas e, além disso, verificou-se que o estágio de lactação tem influência sobre o teor de proteína (P=0.001). A concentração de proteína decresce gradualmente a partir do meio da lactação em diante (Medhammar et al., 2012). A lactose apresentou média de 6.71%, confirmando a alta taxa deste açúcar no leite equino, pois é o principal substrato energético do mesmo (Spers et al., 2006). A média do teor de lactose no leite de éguas Crioulas foi levemente superior a média obtidos por Reis et al., (2007) na raça Mangalarga Marchador. A alta taxa de lactose aumenta a palatabilidade do leite e estimula a absorção intestinal do cálcio, tendo importante função na formação da estrutura óssea dos potros (Reis et al., 2007;). Todos os

componentes do leite são influenciados pelo estágio de lactação, exceto a lactose (P=0.2880) (Medhammar et al 2012). E também, esta não apresenta variação conforme a dieta (Doreau et al., 1991), porém foi observada uma diferença individual (P=0.0001).Os sólidos totais apresentaram uma média de 9.24%. Os teores de sólidos totais também variam conforme o estágio de lactação, sendo o valor mínimo 7.85% e o valor máximo encontrado foi 10.53% (P=0.0113). Também houve diferença dos valores dos teores de sólidos totais entre as éguas, mostrando que esta variável também é influenciada por características individuais (P=0.0001). Os sólidos totais representam a soma de todos os componentes sólidos presentes no leite e traduzem a concentração real dos mesmos, eliminando a influência do teor de água. Na tabela1, pode-se observar a média e a variação dos componentes do leite das éguas estudadas.

Tabela 1. Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo dos principais componentes do leite de da raça Crioula.

	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)
Média±DP	0,57±0,38	1,95±0,52	6,71±0,96	9,24±0,85
Minimo	0	0,16	5,52	7,85
Máximo	1,57	3,45	10,71	10,53

CONCLUSÃO

Neste estudo, foram descritos pela primeira vez os valores médios dos principais componentes do leite de éguas da raça Crioula e verificado que esses componentes podem variar de acordo com o individuo e com o estágio de lactação. Estes dados podem auxiliar os criadores na elaboração de dietas que favoreçam o crescimento dos potros.

REFERENCIAS

ABCCC, 2011. Anuário Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos. Ano 51, nº 48.

Csapó, J., Salamon, S., Lóki, K., Csapó-Kiss, Z. 2009. Composition os mare´s colostrum and milk II. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro-elements. Acta Univ Sapientiae, Alimentaria. 2(1): 133-148.

Csapó, J., Stefler, J., Martin, T.G., Makray, S., Csapó-Kiss, Z. 1995. Composition of Mares' Colostrum and Milk. Fat Content, Fatty Acid Composition and Vitamin Content. Dairy Journal. 5: 393-402.

Doreau, M., et al., 1991. Voluntary Intake, Milk Production and Plasma Metabolites in Nursing Mares Fed Two Different Diets. Journal of Nutrition. 122, 992 – 999.

Gibbs, P.G., Potter G.D., Blake, R.W., Mcmullan, W.C. 1982. Milk production of Quarter Horse Mares during 150 days of lactation. J. Anim. Sci. 54: 496-499.

Holmes, A.D., Spelman, A.F., Smith, C.T., Kuzmeski, J.W. 1947. Composition of mare´s milk as compared with that of other species. Journal of Dairy Science. 30(6): 385-395.

Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., Mariani, P. 2002. Protein and fat composition of mare´s milk: some nutritional remarks with reference to human and cow´s milk. International Dairy Journal. 12: 869-877.

Medhammar E., Wijesinha-Bettoni R., Stadlmayr B., Nilsson E., Charrondiere U.R., Burlingame B. 2012. Composition of milk from minor dairy animalsand buffalo breeds: a biodiversity perspective. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92:445-474.

Oftedal, O.T., Hintz, H.F., Schryver, H.F., 1983. Lactation in the Horse: milk composition and intake by foals. The Journal of Nutrition. 113(10): 2096-2106.

Pietrzak-Fiećko R; Tomczyński R; Świstowska A; Borejszo Z; Kokoszko E; Smoczyńska K., Effect of mare's breed on the fatty acid composition of milk fat. Czech J. Anim. Sci. 54(9), 403 – 407.

Pikul, J., Wójtowski, J., 2008. Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares´colostrum and milk during five lactation months. Livestock Science. 113: 285-290.

Reis, A.P., Mesquita, A.J., Moreira, C.H.G., Curado, A.P., Silva, E.B., Nicolau, E.S. 2007. Composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador. Rev Inst Adolfo Lutz. 66(2): 130-135.

Salimei, S., Fantuz, F. 2012. Equid milk for human consumption. International Dairy Journal. 24: 130-142.

Salamon, R.V., Salamon, S., Csapó-Kiss, Z., Csapó, J. 2009. Composition of mare´s colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamins contents. Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria. 2(1): 119-131.

Schryver H.F., Oftedal, O.T., Williams, J., Soderholm, L.V., Hintz, H.F. 1986. Lactation in the horse: the mineral composition of mare milk. The Journal of Nutrition. 116: 2142-2147.

Spers, R.C., et al., 2006. Efeito da suplementação da dieta com óleo de babaçu sobre a composição do sangue e leite de éguas em lactação. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 43, 109 – 119.

Ginecología ♯ 6

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAVALOS CRIOULOS EM SISTEMA DE MONTA CONTROLADA NO RIO GRANDE DO SUL

Eficiencia reproductiva de caballos criollos en un sistema de monta controlada en Rio Grande do Sul

Reproductive efficiency in Criollo horses in controled breeding at Rio Grande do Sul

***Costa VGG*[1]; *Andriola YT*[1]; *Duval LH*[1,2]; *Duval EH*[3]; *Duval EJCP*[4]; *Corcini CD*[1]; *Fiala Rechsteiner SM*[2].**

1Laboratório de Reprodução Animal – ReproPEL – Favet – UFPel; 2Historep – Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – UFPel; 3Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA–Favet–UFPel; 4Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel– Faem – UFPel;Telefone:+ 555499363077,E-mail: vitoria.guazzelli@hotmail.com*; Endereço: Santa Cruz, 1948-704, Pelotas-RS-Brasil*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia reproductiva de caballos Criollos mantenidos en un sistema de cría controlada. Este estudio se realizó en dos criaderos de caballos criollos: una situada en el sur y otro en el noreste de Río Grande del Sur. Fueron analizados los datos retrospectivos de cuatro temporadas reproductivas. Después de la detección del estro, las yeguas fueron servidas cada 48 horas. La tasa de preñez en la propiedad 1, se incremento con el tiempo. No se encontraron diferencias con respecto a las variables analizadas.

RESUME

The aim of this study was to evaluate the reproductive efficiency of Criollo horses kept in a controlled breeding system. This study was conducted on two farms of Criollo horses: one located in the south and another in northeastern of Rio Grande do Sul. Retrospective data from four breeding seasons were analyzed. After estrus detection, mares were bred every 48 hours. The pregnancy rate in property 1, increased over time. No differences were found regarding to the variables analyzed.

INTRODUÇÃO

Os cavalos da raça Crioula destacam-se entre as demais por enfrentar adversidades climáticas e se manter em campos nativos pobres devido a pouca exigência alimentar (Pons,1993). A rusticidade do cavalo Crioulo está diretamente ligada a duas outras características: a fertilidade e a longevidade, sendo esses atributos essenciais na determinação

de boas condições de produtividade (Dowdall, 1987). A criação de equinos Crioulos é de grande importância no estado do Rio Grande do Sul, seja por motivos culturais ou econômicos. Devido a isso questões correlacionadas com a reprodução tem recebido um maior enfoque. Com a valorização raça, os proprietários que possuem animais de alto valor zootécnico investem num manejo reprodutivo mais seguro – a monta controlada. Nesta o garanhão encontra a égua apenas nos momentos de cobertura, diminuindo os riscos de acidentes tanto com os machos quanto com as fêmeas e possibilitando o controle da reprodução, com a programação das coberturas e partos, e maior identificação de problemas reprodutivos. (Richter, et al., 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar os índices reprodutivos de cavalos Crioulos mantidos em sistema de monta controlada, e verificar a influência do manejo de diferentes propriedades sobre esse sistema.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em dois criatórios de cavalos Crioulos localizados em diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Um deles, com 82 éguas, localizado no município de Dom Pedrito (1), região da campanha, Sul do estado. O outro, com 51 éguas, situado no município de Vacaria (2), região dos Campos de Cima da Serra, Nordeste do estado. Em cada uma das propriedades, foram analisados dados retrospectivos de quatro temporadas reprodutivas seguidas, do ano de 2008 a 2011, com ambas adotando o manejo de monta controlada (éguas vazias e com cria ao pé). No criatório 1, o estro era detectado pelo próprio garanhão e, então, essas fêmeas eram devidamente contidas e cobertas por este (n=1) a cada 48 horas, até o fim do mesmo. Já no criatório 2, as fêmeas eram submetidas a exame de ultrassonografia transretal para identificação do estro, e após levadas até o garanhão (n=8) para realização das coberturas, também com intervalo de 48 horas. Foram analisados a idade média das fêmeas e dos garanhões, o sexo dos potros, a taxa de prenhez total e em relação a diferentes fatores: idade das éguas, idade do garanhão, temporada e garanhão. As éguas foram dispostas em três grupos conforme as suas idades, sendo grupo 1 até 12 anos, 2 de 13 à 20 e o grupo 3 com mais de 20 anos. Os dados foram analisados utilizando o teste de variância (ANOVA), distribuição de frequência e estatística descritiva utilizando o programa Statistix 9.0.

RESULTADOS

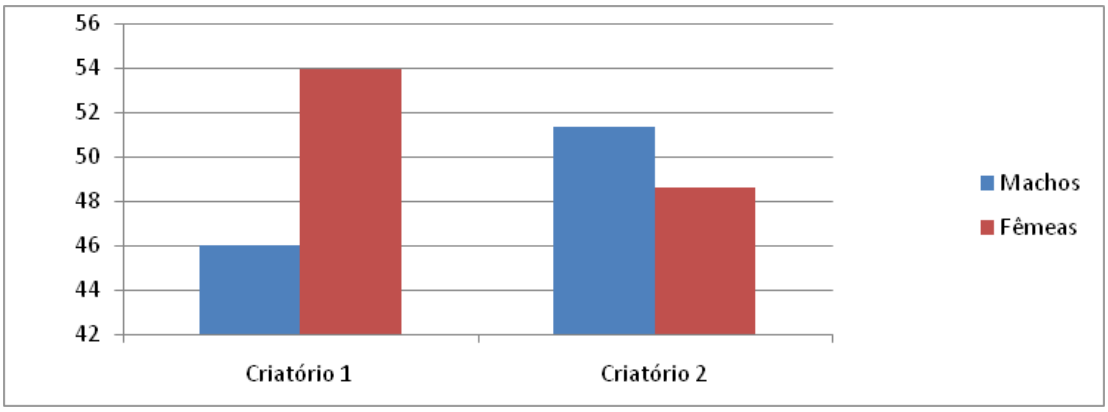
Na tabela 1, observa-se a taxa de prenhez de cada uma das propriedades nas quatro temporadas analisadas. Observa-se no criatório 1 que 72,4% das éguas pariram. Dentre estes partos, 46% foram de machos e 54% de fêmeas. Nessa propriedade, a idade média das mães foi de 14,3 anos, e a do único garanhão utilizado foi de 7,5 anos. No criatório 2, das éguas analisadas, 82,7% pariram. Estas apresentaram 51,4% partos de machos e 48,6% partos de fêmeas. A idade média das éguas reprodutoras foi 6,3 anos. Os oito garanhões utilizados pela propriedade apresentaram idade média de 10,5 anos. O gráfico 1 apresenta o total de machos e fêmeas nascidos nos criatórios.

Tabela 1: Taxa de prenhez em relação a temporada reprodutiva

Temporada Reprodutiva	Propriedade 1	Propriedade 2
2008	57,9%a	84,2%a
2009	59%a	86,4% a
2010	80%a,b	84,2% a
2011	92,6%b	76% a
Média Total	72, 4%	82,7%

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa P<0,001

Gráfico 1: Número de machos e fêmeas nascidos



Observou-se um aumento na taxa de prenhez das éguas (P=0,0063) cobertas pelo garanhão utilizado pelo criatório 1 no decorrer do tempo. À medida que sua idade aumentava diminuía o número de éguas falhadas na propriedade. Em 2008, 57,9% das fêmeas emprenharam, já em 2011, esse número passou para 92,6%. Quanto aos garanhões utilizados no criatório 2, não se observou diferença quando relacionados prenhez, idade e temporada, o que provavelmente está relacionado ao maior número de garanhões utilizados. Nas duas propriedades, não houve diferença nas taxas de prenhez quando as éguas foram agrupadas por idade, sendo que a prenhez nas duas propriedades foi de 81,9% no grupo 1, seguido do grupo 2 – 72,3% e posteriormente o 3 com 66,7%.

DISCUSSÃO

A fertilidade das fêmeas está intimamente relacionada com a idade. Carnevale; Ginther (1992) analisaram grupos de éguas jovens (5 a 7 anos) e velhas (mais de 15 anos), observando que há diferença entre eles na taxa de prenhez e na incidência de perda embrionária, diferente dos resultados do presente estudo, o que provavelmente se deve a longevidade e rusticidade da raça. O comportamento sexual de garanhões utilizados em monta controlada é influenciado pela experiência e pelo aprendizado (McDonnell, 1992). Isso, aliado a maturidade sexual, pode ser fator para o aumento da fertilidade do garanhão do criatório 1 com o passar dos anos.

CONCLUSÃO

A raça crioula é extremamente rústica, pois se adapta e reproduz em regiões de diferentes climas e pastagens, além de responder positivamente a diferentes modos de manejo reprodutivo.

REFERÊNCIAS

Carnevale, E. M.; Ginther, O. J., 1992. Relationship of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. Theriogenology, v.37, n.5, p.1101-15.

McDonnell, S.M., 1992. Normal and abnormal sexual behavior. In: Blanchard, T.L., Verner, D.D.(eds.), Stallion Management. Vet. North Equine Pract. 8, 71,89.

Dowdall, R.C., 1987. Criando Criollos. 3º ed. Montevideo: Editorial Hemeisférico Sur S.A., 409p.

Pons, D.S., 1993. O Cavalo Crioulo: seis décadas de experiência. Guaíba, Agropecuária, 143p.

Richter, G., Muller, G., Macial F. C., Gregory R. M., Mattos R.C., 2007. Desempenho reprodutivo de éguas crioulas em regime de monta controlada. Salão de Iniciação Científica UFRGS, Porto Alegre, RS, out. 21-26.

Ginecología # 7

FERTILIDADE DO CIO DO POTRO EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA

Fertilidad del celo del potro en yeguas de raza Criolla

Foal heat fertility in Criollo breed mares

***Duval H*[1,2]; *Andriola YT*[2]; *Costa VGG*[2]; *Duval EH*[3]; *Duval EJCP*[4]; *Varela Junior AS*[2]; *Corcini CD*[2]; *Fiala Rechsteiner SM*[1]**

[1]HISTOREP – Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – UFPel; [2]Laboratório de reprodução animal – ReproPEL Faculdade de Veterinária – UFPel; [3]Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA, Faculdade de Veterinária –UFPel; [4]Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – UFPel; Telefone: (53) 81250406, E-mail: luzia_hallal_duval@hotmail.com

RESUMEN

Se realizo un estudio retrospectivo durante cuatro años con el fin de evaluar la fertilidad post parto en yeguas Criollas. Lasyeguas se presentaron para controlar la reproducción provenientes de dos criaderos situados en los extremos de Rio Grande do Sul, Brasil. Se utilizaron 82 yeguas del criadero A y 51 del B. Las yeguas fueron servidas cada 48 horas durante el estro. La tasa de preñez fue mayor (P <0,01) en el criadero B (86,3%), que tenía un manejo más rígido. No hubo diferencia en las tasas de *preñez obtenidas en el celo del potro con respecto a otros celos. Las yeguas viejas tuvieron, en promedio, menores tasas de preñez (P <0,01).*

RESUME

A four years retrospective study was conducted in order to evaluate the post partum fertility of Criollo mares. Mares were submitted to control breeding in two studs located in the extreme points of Rio Grande do Sul, Brazil. Eighty- two mares from the stud A were used and 51 from the stud B. The mares were bred every 48 hours during estrus. The overall pregnancy rate was higher (P <0.01) on the stud B (86.3%), which had a more rigid management. There was no difference in pregnancy rates obtained in foal heat compared to other estrus. Older mares had overall pregnancy rates lower (P <0.01), but this did not occur in relation to estrus and other foal estrus.

INTRODUÇÃO

Os animais da espécie equina existem há cerca de 50 milhões de anos,desde o período denominado Eohipus (Lerner, 1998). Com a sua evolução e consequente domesticação, estes animais adaptaram-se a diferentes regiões, e devido à seleção natural aperfeiçoaram-se. Isto levou ao desenvolvimento de algumas raças dentre estas araça Crioula. Os cavalos pertencentes a esta raça são originários dos cavalos trazidos da Península Ibérica, durante a colonização do Brasil, Uruguai e Argentina que se reproduziram livremente duran-

te anos. (ABCCC, 2009).Atualmente, a indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda(CNA, 2006), no sul do Brasil gerada principalmente dos cavalos da raça Crioula. Com isso, os criadores priorizaram um manejo reprodutivo que garanta uma maior segurança para esses animais de alto valor zootécnico. Desse modo, o manejo de monta controlada foi a solução encontrada. Esta, por sua vez, apresenta inúmeras vantagens uma delas o controle do momento do parto e o primeiro ciclo estral posterior a este, denominado "cio do potro", ou seja, o estro que teve início até o 14º dia pós-parto, como recomendado pela *WorkingPartyonTerminology*(1982), e cuja ovulação ocorreu até o 20º dia pós-parto (Loy, 1980).A fertilidade do cio do potro é considerada inferior a de estros subsequentes (Malschitzky e Mattos, 2004).O objetivo dopresente trabalho foi avaliar a eficiência reprodutiva de éguas que foram cobertas no cio do potro.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho descrito é um estudo epidemiológico retrospectivo referente ao manejo reprodutivo de 4 anos (2008 a 2011) realizado em duas propriedades localizadas em municípios distintos do Rio Grande do Sul, Brasil,sendo a propriedade A em Dom Pedrito, região da Campanha e a propriedade B em Vacaria, região de Campos de Cima da Serra. Ambas realizavam o manejo de monta controlada e todos os animais utilizados no estudo possuíam fertilidade conhecida. Na propriedade A foram utilizadas 82 éguas separadas em grupos conforme a idade, sendo G1: até 12, G2: de 12 à 20 e G3: mais de 20 anos e apenas um garanhão, o qual já tinha experiência de cobertura em manada. Nesse criatório, a detecção do estro era realizada pelo próprio garanhão, pelo métododе rufiação das éguas, sem nenhuma interferência humana. Após a detecção do estro, a égua era devidamente contida, sendo realizadas três coberturas a cada 48 horas. Já na propriedade B foram utilizadas 51 éguas também separadas em três grupos e 8 garanhões. A detecção do estro nas éguas era realizada através do exame de ultrassonografia transretal e no momento em que a égua apresentasse sinais de estro três coberturas com intervalo de 48 horas eram realizadaspor estro. Não foi detectado o momento da ovulação, se considerou a data da última cobertura. Ao final de cada temporada os dados reprodutivos eram tabelados para posterior avaliação.Para fins de analise, as éguas paridas foram separadas em 3 grupos, sendo E0:éguas com potro e vazias, E1:éguas cobertas no cio do potro e E2: éguas cobertas em um estro posterior ao cio do potro. Os dados foram analisados por distribuição de frequência e análise de Qui-quadrado para as características categóricas utilizando*software* Statistix 9.0® (2008).

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra que a taxa de prenhez das quatro temporadas foi mais alta na propriedade B(86,3%), localizada em Vacaria, não sendo encontrada diferença entre o cio do potro e estros posteriores.

Tabela 1: Percentual de prenhez nas propriedades estudadas

Localidade	Vazia	Prenha	
Propriedade A (n=82)	56,1% (46) [b]	43,9% (36) [b]	
		Cio do potro 15,9% (13)[z]	Outro Cio 28,0% (23)[z]
Propriedade B (n= 51)	13,7% (7)[a]	86,3% (44)[a]	
		Cio do potro 43,1% (22)[z]	Outro Cio 43,1% (22)[z]

[a,b] Letras diferentes demonstram diferença estatística na mesma coluna (P<0,001) através do Chi-quadrado.

[Z] Não ocorreu diferença estatística na mesma linha e coluna (P<0,001) através do Chi-quadrado.

A Tabela 2 mostra que a fertilidade é inversamente proporcional a idade das éguas, sendo o G:1 o grupo com maior taxa de prenhez (64,4%). Observa-se que o G:1 e G:2 apresentaram índices mais altos de prenhez após o cio do potro.

Tabela 2: Percentual de prenhez distribuído em relação à idade daséguas nas duas propriedades.

Idade das éguas	Vazia	Prenhezconfirmada	
G1 (5-12 anos) (n=59)	35,6% (21)[a]	64,4% (38)[a]	
		Cio do potro 27,1% (16)[z]	Outro Cio 37,3% (22)[z]
G2 (13-20 anos) (n= 64)	40,6% (26)[ab]	59,4% (38)[ab]	
		Cio do potro 25% (16)[z]	Outro Cio 34,4% (22)[z]
G3 (mais de 21 anos) (n= 9)	66,6% (6)[b]	33,4 % (3)[ab]	
		Cio do potro 22,2% (2)[z]	Outro Cio 11,2 (1)[z]

[a,b] Letras diferentes demonstram diferença estatística na mesma coluna (P<0,001) através do Chi-quadrado.

[Z] Não ocorreu diferença estatística na mesma linha e coluna (P<0,001) através do Chi-quadrado.

DISCUSSÃO

O baixo índice de prenhez na propriedade A se deve provavelmente ao fato de que a cabanha trabalha com um manejo pouco controlado.A detecção do estro realizada pelo próprio garanhão também influencia na apresentação desse estro, poiso comportamento da égua durante ocio do potro apresenta grande variabilidade, visto que a ansiedade gerada pelo afastamento do potro, ainda que por pouco tempo devido à aproximação do garanhão, para a prática da rufiação, faz com queboa parte das éguas não demonstre sinais externos de cio(Malschitzky e Mattos, 2004). A idade das éguas é considerada como um fator determinante na eficiência reprodutiva (Filho et al., 1998). Mesmo na raça Crioula, conhecida por sua fertilidade e rusticidade, éguas velhas que não

conceberam em uma estação reprodutiva apresentam as mesmas alterações de éguas de outras raças, ou seja, alterações degenerativas e inflamatórias do endométrio (Fialaet al., 2011).

CONCLUSÃO

O cio do potro pode ser utilizado em éguas que tiveram parto normal,tendo em vista que permite uma redução do intervalo entre partos e apresenta taxa de fertilidade semelhante secomparada a dos demais estros.

REFERÊNCIAS

ABCCC, 2009. Manual do Criador da Associação dos Criadores dos Cavalos Crioulos.

Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA, 2006. Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Brasília: CNA.

S.M. Fiala, C.A. Pimentel, A.M. Hammes; S. Ladeira, A.K. Tarouco, R.C. Mattos, 2012. Inflammatory and degenerative changes in the endometrium of mares of the crioulo breed. Pferdeheilkunde v. 28 p. 21-26.

Filho, M. K.; Alda, J. L.; Deprá, N. M.; Brass, K. É.; Corte, F. D. de La.; Silva, J. H. S.; Silva, C. A. M.; Emanuelli, I. P., 1998. Fertilidade pós-parto em éguas Puro-Sangue de Corrida. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 35, n. 2, p. 75-79.

Lerner, M., 1998. Cavalos – Guia Prático. São Paulo : Editora Nobel, p. 64.

Loy, R.G.,1980 Characteristics of postpartum reproduction in mares. Vet Clin North AmLargeAnimPract; v. 2 p. 345-359.

Malschitzky, E., Mattos, R. C., 2004. Manejo Reprodutivo do Puerpério na Égua. Revista Veterinária em Foco Vol.2, p. 73 – 88.

Mattos, R.C., 1989. Manejo reprodutivo da égua. In: TARANTO, J.R. Sangue e Raça. Rio de Janeiro, RJ. Ed. Index Ltda., p. 69-81.

Working Party on Terminology, Recommendations, 1982. Journal of Reproduction and Fertility, (Supplement), v.35, p.647-652.

INFLUENCE OF SEASONALITY ON STRUCTURAL DEVELOPMENT OF THE CORPUS LUTEUM IN MARES: PRELIMINARY RESULTS

Influencia de la estacionalidad sobre el desarrollo del cuerpo luteo en yeguas: resultados preliminaries

***Ferreira JC*[1]*, Boakari YL, Canesin HS, Novaes Filho LF, Meira C.**

*[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Botucatu, SP, Brasil, Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970 *phone: 55 14 81372228; e-mail: jaircfvet@yahoo.com.br*

RESUMEN

La ultrasonografia Doppler Color es utilizada en la evaluación estructural del cuerpo lúteo (CL) y subsecuentemente en la estimación de su función secretoria. Un rápido desarrollo del sistema vascular luteal se observa en los primeros días post-ovulación. Dos grupos experimentales (grupo 1: CL originado en la primera ovulación de la temporada y grupo 2: CL originado en la siguiente ovulación, n=6 yeguas por grupo) fueron utilizados para evaluar el efecto de la estacionalidad sobre el desarrollo estructural del cuerpo lúteo en yeguas. Fueron evaluadas la perfusión vascular luteal y el area del CL. Un incremento progresivo (p<0.01) y similar (p>0.1) de la perfusión vascular del CL fue observado desde el dia 0 (día de la ovulación) al día 8 en ambos grupos. No fue detectada una sincronía entre la hemodinamia y el área del CL (p>0.1). La angiogenesis y flujo sanguíneo del CL temprano y de mitad del ciclo, originados en la primera y siguientes ovulaciones, fueron similares.

RESUME

Color Doppler ultrasonography has been currently used for the evaluation of the structural status of the corpos luteum (CL) and subsequently estimation of its secretory function. A rapid development of an extensive luteal vascular system is observed from the first days post-ovulation. Two experimental groups (Group 1: CL originated from the first ovulation of the breeding season; and Group 2: CL originated from subsequent ovulation, n=6 mares/group) was used to evaluate the effect of the seasonality on the CL structural development in mares. Luteal vascular perfusion and area of the CL were evaluated. A progressively (P<0.01) and similar (P>0.1) increase on vascular perfusion of the CL was observed from D0 (day of ovulation) to D8 in both groups. No synchrony between hemodynamics and area of the CL was detected (P>0,1). Angiogenesis and blood flow of early and midcycle CL's originated from the first ovulation of the breeding season are similar to the observed on posterior estrous cycles.

INTRODUCTION

The prolongation of the corpus luteum (CL) lifespan and the continuous production of progesterone (P4) are necessary for pregnancy maintenance (Allen, 2001). Doppler ultrasonography is a non-invasive real time pulse-wave technique recently used for transrectal study of the reproductive system hemodynamics in mares. This technology has been currently used for the structural evaluation of the CL and, subsequently, estimation of its secretory function (Ferreira and Meira, 2011). The CL is a dynamic structure that requires rapid development and regression of an extensive vascular system. Therefore, a progressively and intense development of the luteal vascular network is observed doing of this transitory gland highly vascularized few days post-ovulation. The mechanisms involved on GnRH stimulation and gonadotropin secretion through distinct seasons of the year in mares had been previously described (reviewed by Williams et al., 2012). However, the influence of the seasonality on the luteogenesis is unclear at this moment. The aims of the present study were: a) to characterize the vascular perfusion of young and mature CLs originated from the first ovulation of the breeding season, and b) to evaluate the effect of seasonality on the CL structural development in mares.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted through July and October in Southern Hemisphere (22°52'20"S). Mares (n=6) were housed at CERBEQ, Reproduction Center of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, UNESP, Brazil. The animals were scanned daily for follicular development monitoring and induction of ovulation treatment was done when a preovulatory follicle reached 35mmin diameter associated with uterine edema. Day of ovulation was considered day 0 (D0). All mares were used in two distinct groups (n=6 mares/group) designed according to the moment of the ovulation through the breeding season: Group 1 (CL originated from the first ovulation of the breeding season) and Group 2 (CL originated from the second or third ovulation of the breeding season). Power-flow Doppler ultrasound instrument (Sonovet Pico, Medison Co., Ltd) equipped with a linear-array transducer (LV5-9CDn, 60nn) was used for transrectal scanning of the CL. The entire CL was scanned in a slow continuous motion as described by Ginther et al. (2008).The end points evaluated were vascular perfusion and area of the CL. Luteal vascular perfusion was estimated subjectively using the extent of luteal tissue (0-100%) with color signals Doppler during a real-time imaging exam. The area (mm^2) of each cross section of the CL was measured using scanner's tracing and B-mode functions. Luteal area for each examination was determined from maximum area averaged from two still images. B-mode and Color Doppler ultrasonography exam of the CL were performed every day from D0 to D8. The data were analyzed by two-way repeated measure for main effects of group (G) and day post-ovulation (D) and their interaction (G:D). Differences between two means were evaluated by Turkey's test. A probability of $P \leq 0.05$ was used to indicate significance. Data are presented as mean±S.E.M.

RESULTS

A progressively and similar increase on vascular perfusion of the CL was observed ($P<0.001$) in both groups (Table 1). The luteal dimension inside each group did not differ ($P>0.1$) from D0 to D8 (Table 2). However, the mean area of the CL in mares from Group 1 was greater ($P<0.001$) than in mares from Group 2 (451.3±46.19 mm^2 and 357.2±41.19 mm^2, respectively; Table 2).

Table 1.Mean±S.E.M vascular perfusion of the CL originated from the first and subsequent ovulations of the breeding season. Main effects of group (G), day (D), and their interaction (GD) are shown.

Day post-ovulation	Vascular Perfusion of the CL†		Mean±S.E.M
	Group 1*	Group2Ω	
0	18.3±4.6	15.8±3.3	17.1±2.5e
1	22.5±4.6	15.9±3.2	19.2±2.6e
2	27.5±4.4	25.0±5.5	26.3±3.1de
3	31.7±4.2	40.8±4.2	36.3±2.9cd
4	49.2±5.7	48.3±6.3	48.8±3.7bc
5	56.7±7.0	65.8±4.0	61.3±3.8ab
6	60.8±6.0	71.7±3.6	66.3±3.4a
7	70.8±4.2	75.0±2.2	72.9±2.2a
8	73.3±4.9	73.3±1.7	73.3±2.3a

†area(0 to 100%) of the CL with color signals Doppler; * CL originated from the first ovulation of the breeding season; ΩCL originated from the second or third ovulation of the breeding season

a, b, c, d, e distinct letters within the same column are statistically different (P<0.01); G: P>0.1; D: P<0.001; GD: P>0.1

Table 2.Mean±S.E.M area of the CL originated from the first and subsequent ovulations of the breeding season. Main effects of group (G), day (D), and their interaction (GD) are shown.

Day post-ovulation	Area of the CL†	
	Group1*	Group2Ω
0	469.3±53.9	314,9±19.6
1	461.1±46.7	336,7±32.2
2	480.7±49.4	400,6±18.3
3	484.1±61.6	395,8±45.5
4	495.9±56.7	390,9±49.5
5	478.4±42.7	362,0±54.3
6	405.3±29.3	360,2±56.2
7	428.4±44.7	322,5±50.7
8	358.9±30.6	331,2±44.1
Mean±S.E.M	451.3±41.17a	357,2b

†area(mm^2) of cross sectional imaging of the CL in B-mode function; * CL originated from the first ovulation of the breeding season; Ω CL originated from the second or third ovulation of the breeding season; a, b distinct letters within the same line are statistically different (P<0.001);

G: P>0.1; D: P<0.001; GD: P>0.1

DISCUSSION

This is the first report of the seasonality effect on the luteal blood flow in mares. Our findings indicated that structural development of the CL originated from the first ovulation of the breeding season is similar to the observed in subsequent estrous cycles. Considering the positive relationship between luteal vascular perfusion and P4 release capability

of the CL and the asynchrony between dimension and secretory function of the CL (Ginther et al., 2007), our findings suggest that young and mature CLs from the first cycle of the breeding season are functional. However, the influence of the seasonality on the CL lifespan and luteolysis phenomena is still unknown. Studies from our lab are being concluded to characterize plasma P4 concentration changes during distinct moments of the breeding season in mares.

CONCLUSION

Angiogenesis and blood flow of early and midcycle CL's originated from the first ovulation of the breeding season are similar to the observed on posterior estrous cycles. Measurement of luteal area is not an effective method for the evaluation of structural development of CLs in mares.

SOURCES OF FUNDING: this research was supported by FAPESP, Brazil.

REFERENCES

Allen WR. 2001. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. Reproduction, 121,513-527.

Ferreira JC; Meira C. 2011. Potential use of doppler ultrasound in equine embryo transfer programs Ciência Rural, 6, 1063-1069.

Ginther OJ; Gastal EL; Gastal MO; Utt MD; Beg MA.2007 Luteal blood flow and progesterone production in mares. Animal Reproduction Science. 99, 213-220.

Ginther OJ; Rodrigues BL; Ferreira JC.;Araujo RR; Beg MA. 2008. Characterization of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. Reproduction, Fertility and Development,20, 684-693.

Williams GL; Thorson JF; Prezotto LD; Velez IC;Cardoso RC; Amstalden M. 2012. Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. Domestic Animal Endocrinology, 43, 103-115.

Ginecología ♯ 9

LUTEOPROTECTIVE AND ANTI-ABORTION ROLES OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (ECG) DURING PREGNANCY IN THE MARE

Rol luteotropico y antiabortivo de la gonadotrofina corionica equina (egc) durante la gestacion en la yegua

Flores-Flores G[a]; Velázquez-Cantón E[a]; Boeta M[ab]; Zarco L.[a]

[a]Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México. [b]amyriam@unam.mx *01152-555585321123*

RESUMEN

*Los efectos de la administración repetida cloprostenol fueron comparados en yeguas pre*ñadas por caballos y yeguas preñadas *por burros con el fin de evaluar el papel de eCG sobre el desarrollo de la preñez asociada a la resistencia a los efectos luteolíticos y abortivos de PGF2a. Fueron utilizadas 11 yeguas preñadas por burros y 9 yeguas preñadas por caballos. Seis yeguas con preñez de mula y cinco con preñez de equino fueron inyectadas con cloprostenol (0,25 mg) entre el día 65 y el día 75 de la gestación (tiempo 0), y el tratamiento se repitió a las 48, 72 y 96 hs. El resto de las yeguas permanecieron como controles. Las concentraciones de eCG fueron 10 veces mayores (p <0,001) en las yeguas preñadas por caballos que en las yeguas preñadas por burros, y no se vieron afectados por el tratamiento cloprostenol. La luteólisis fue completa 30 horas después de la inyección de cloprostenol en yeguas con preñeces de mulas, mientras que las yeguas con preñeces de equinos requirio 96 horas y tres inyecciones de cloprostenol para completar la luteólisis. El análisis de regresión reveló asociaciones significativas entre las concentraciones de eCG en tiempo 0 y el tiempo necesario para la finalización de la luteólisis (p <0,001), muerte fetal (p <0,01) y la expulsión fetal (p <0,05). Se concluye que las altas concentraciones de eCG en yeguas preñadas por caballos protege los cuerpos lúteos de preñez en contra de los efectos luteolíticos de PGF2a. La deficiencia de eCG en yeguas preñadas por burros los hace más susceptibles al efecto luteolítico de PGF2a, y esto puede ser una causa importante del aumento de la mortalidad fetal que se produce entre el día 60 y el día 90 de la gestación en estas yeguas.*

INTRODUCTION

The role of equine chorionic gonadotropin (eCG) is not completely understood (Allen and Stewart, 2001). It has been suggested that eCG might have a redundant role in order to protect pregnancy in cases of special need (Boeta and Zarco, 2010; 2012), for example, it could protect the CL of pregnancy against endogenous release of PGF2α. In this respect, PGF2α release and active luteolysis has been found to occur occurs during colic, laminitis, endotoxemia and other pathological processes in mares (Daels et al, 1989). In case of pregnant mares that produce very small or no eCG, such as mares carrying mule pregnancies (Boeta and Zarco, 2005, 2012) or xenogenic donkey pregnancies (Allen, 1975) appear to be more vulnerable to endogenous release of PGF2α, as suggested by the high incidence of

abortions in which fetal death is immediately preceded by an abrupt fall in progesterone concentrations in mule pregnancies (Boeta and Zarco, 2005; 2010) and in donkey-in horse pregnancies (Allen, 1975). The objective of this study was to use the mare impregnated by donkey, a natural model of eCG deficiency, in order to assess the role of this hormone on the development of resistance to PGF2α in pregnant mares.

MATERIALS AND METHODS

Eleven mares impregnated by donkey and 9 mares impregnated by horse were used. Six mares with mule pregnancy and five with equine pregnancy were injected with cloprostenol (0.25 mg) between day 65 and day 75 of pregnancy (time 0), and the treatment was repeated 48, 72 and 96 h latter. The rest of the mares remained as controls. In all groups the treatments were repeated at 48, 72 and 96 hours after the first injection. Blood samples for hormone determinations were obtained immediately before the first treatment (time 0), every 6 hours for the first 36 hours after the first injection, immediately before each subsequent injection (48, 72 and 96 hours), and every 24 hours thereafter until 168 h (7 days) had elapsed from the time of the first injection. Blood samples were obtained by jugular vein puncture in vacuum tubes with serum activator gel (BD Diagnostic systems, México City). Progesterone was determined in blood samples, and eCG was measured only on samples obtained at 0, 24, 48 and 72 h. Luteolysis was considered to have been be completed when progesterone concentrations first decreased below 1 ng/ml (Boeta and Zarco, 2005). Ultrasonographic observations of the fetus were conducted immediately before the first injection, and every 12 h thereafter until the product was expelled. Fetal death was considered to have occurred when no cardiac beat or fetal movements were found during an ultrasonographic examination, and abortion was considered complete when the fetus was expelled (Boeta and Zarco, 2005, 2010).

RESULTS

Figure 1 shows that at all time the concentrations of eCG were significantly higher ($p<0.001$) in mares impregnated by horses than in mares impregnated by donkeys, and they were not affected by cloprostenol treatment.

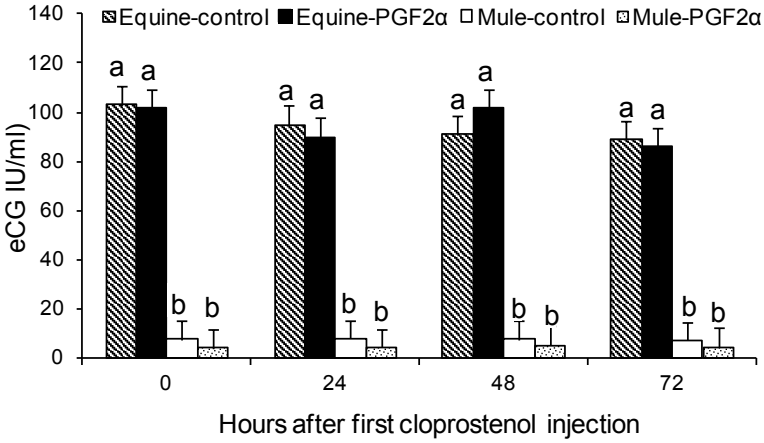


Figure 1. Concentrations of eCG immediately before (0) and at different intervals after the first treatment with 0.25 mg of a synthetic PGF2α (cloprostenol) or with 1 ml of physiological saline solution in mares impregnated by horse and mares impregnated by donkey. Treatments were repeated at 48 and 72 h after the first injection. [a,b] Different letters indicate significant differences (p<0.001).

Luteolysis was completed 30 h after the first cloprostenol injection in mares carrying mule pregnancies, while mares with equine pregnancies required 96 h and three cloprostenol injections to complete luteolysis. Regression analysis revealed significant associations between eCG concentrations at time 0 and the time required for completion of luteolysis ($p<0.001$), fetal death ($p<0.01$) and fetal expulsion ($p<0.05$). Within each type of gestation there were no differences between the mares receiving PGF2α and the control mares ($p>0.05$). Treatments with PGF2α did not affect subsequent eCG production, since at all times the concentrations of this hormone were similar to those present in the same group immediately before the first injection (time 0) and to those present in the control group with the same type of pregnancy ($P>0.05$). Progesterone concentrations were higher at all times in control mares impregnated by horses than in control mares impregnated by donkeys ($p<0.01$). No significant temporal variations were observed within any of the control groups. In contrast, the concentrations of progesterone in both groups of mares treated with PGF2α started to decline immediately after the first injection, and in each case the mean progesterone concentrations became significantly lower ($p<0.05$) than the initial values for the group within the first 6 h after the first injection of PGF2α. Figure 2 shows that in the mares assigned to be treated with PGF2α the concentrations of progesterone immediately before applying the first treatment were significantly correlated ($p<0.01$) with the concentrations of eCG present at that time. The regression analysis indicated that progesterone concentrations increased by 1 ng/ml for every 10 IU of eCG.

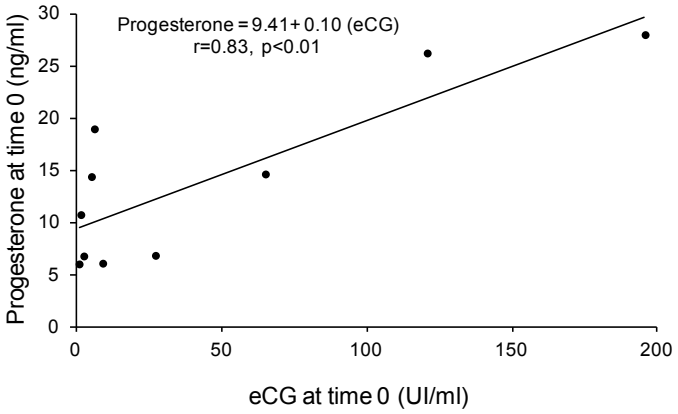


Figure 2. Regression curve of progesterone concentrations at the time of the first cloprostenol injection on eCG concentration present at the same time in pregnant mares.

Figure 3 shows, for each type of pregnancy, the average intervals from the first cloprostenol injection until fetal death was ultrasonographically recorded and until fetal expulsion occurred. Differences between groups were not significant (p>0.5) due to the large within-group variations.

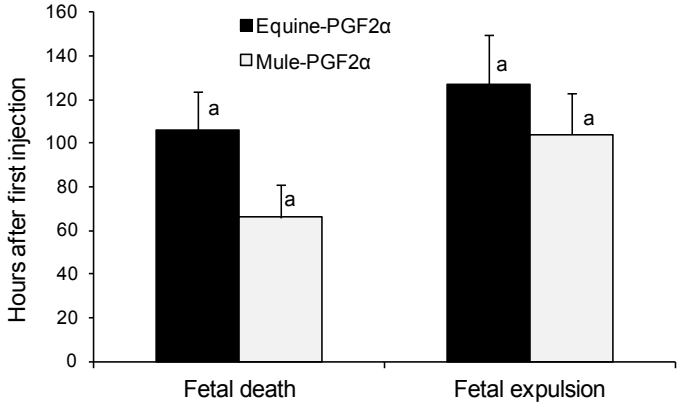


Figure 3.Mean intervals between the first cloprostenol injection to fetal death and to fetal expulsion in mares impregnated by horses (equine pregnancies) or by donkeys (mule pregnancies). The differences between groups are not significant (p>0.05)

DISCUSSION

As expected from previous reports (Boeta and Zarco, 2005, 2010), in this study the concentrations of eCG were much lower in mares impregnated by donkeys than in mares impregnated by horses (Figure 1). Thus, we were able to evaluate the susceptibility to a PGF2α analogue in mares that were in the same stage of pregnancy but with highly divergent eCG concentrations. In addition, there was considerable variation in eCG concentrations within each type of pregnancy, so that we were able to use regression analysis to further evaluate the effects of eCG on luteal resistance to cloprostenol. The results of the present study support the hypotheses of increased luteal sensitivity to PGF2α in mule pregnancies due

to insufficient circulating concentrations of eCG to protect the CLs of pregnancy. Thus, luteolysis was completed after only one injection of cloprostenol in mule pregnancies but not in equine pregnancies. The concentrations of progesterone at the stage of pregnancy in which this the study was conducted were significantly lower in mares impregnated by donkeys than in mares impregnated by horses (figure 2). These differences have been attributed to differences in luteotropic support due to the reduced concentrations of eCG during mule pregnancies (Boeta and Zarco, 2005, 2012). Supporting evidence for the luteotropic role of eCG was provided in the present study by the significant ($p<0.01$) correlation between progesterone and eCG concentrations at time 0, regardless of type of pregnancy. The differences in the initial progesterone concentrations between the two types of pregnancy, and the smaller proportional reduction after the first cloprostenol injection in mares with equine pregnancies may suggest that part of the luteoprotective actions of eCG could be indirectly achieved through its luteotropic effects. It has been demonstrated that exogenous PGF2α administration to pregnant mares causes endogenous release of PGF2α, and that this endogenous release is important for completion of luteolysis and for fetal expulsion (Daels et al, 1995). Several studies have demonstrated that a single dose of PGFα or its analogues does not cause abortion in most mares carrying equine fetuses after day 50-60 of pregnancy (Douglas et al, 1974). All the mares used in this study eventually aborted because cloprostenol injection was repeatedly administered until abortion was completed. It is concluded that mares carrying equine pregnancies are more resistant to the luteolytic and abortifacient effects of exogenous cloprostenol than mares carrying mule pregnancies, and that these differences are due to differences in eCG concentrations between types of pregnancy.

ACKNOWLEDGEMENTS: Gilberto Flores-Flores and Elias Velazquez Cantón were supported by postgraduate scholarships from CONACyT, México. The experimental work was supported by a PAPIIT from DGAPA, UNAM.

REFERENCES

Allen WR. The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids.1975. J Reprod Fertil Suppl. 23:405-13.

Allen, W.R., 2001. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. Reprod.Dom. Anim. 36(3-4):121-131.

Boeta M. y Zarco L., 2005. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnanted by donkeys or stallions. J. Equine Vet. Sci. 25 (12): 531-538.

Boeta, M., Zarco, L., 2010. Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen, Anim. Reprod. Sci. 121(1): 124-130

Boeta M, Zarco L., 2012. Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare. Anim. Reprod. Sci. 130 (2012) 57–62.

Daels P. F., Stabenfeldt G. H., Kindahl H. y Hughes J. P., 1989. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive cycle of the mare: a review. Equine Vet. J. Suppl.8:29-34.

Daels P.F., Mohammed Hussni, Montavon S.M.N., Stabenfeldt G.H., Hughes J.P.,Odensvik K. and Kindahl H., 1995. Endogenous prostaglandin secretion during cloprostenol-induced abortion in mares. Anim. Reprod. Sci. 40:305-321.

Douglas R. H., Squires E. L. and Ginther O. J., 1974. Induction of abortion in mares with prostaglandin F2α. J. Anim. Sci. 39(2):404-407.

COMPARACION ENTRE GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (hCG) Y DESLORELINA EN SUS TIEMPOS DE ACCION, EFICACIA EN INDUCIR OVULACION E INCIDENCIA DE OVULACIONES MULTIPLES EN YEGUAS PURA RAZA CHILENA

Comparison between Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) and Deslorelin on their action times, ovulation induction and multiple ovulation incidence in Chilean Purebred mares

Maturana J[1], Droguett N[2], Ramirez H[3]

[1]Simpson 80 D.92, Viña del Mar, Chile ; [2]Ruta 5 Norte Km24 Parcela B5 Lampa, Santiago, Chile [3]Flor de Azucenas 112 D.111, Las Condes, Santiago, Chile, 56-9-2704708, hernanramirez@bioteq.cl

RESUME

A retrospective study was done using 1032 cycles in Chilean Pure Bred mares between 2006 and 2012. The objective was to compare the efficacy on inducing ovulation, action time to ovulation and multiple ovulation incidence between Human Corionic Gondatrophin (hCG) and Deslorelin. The study was divided in three groups. The control group who received no treatment and the hCG and Deslorelin treated groups. Both treated groups received either hormone when a 35mm follicle was observed during estrous and grade 2 endometrial edema. hCG had a 95% efficacy on producing ovulation versus 99% obtained by Deslorelin. Time range for producing ovulation for hCG was 34-51 hours versus 36-46 hours for deslorelin. The percentage of cycles with multiple ovulations for hCG was 21% versus 31% for deslorelin, while the control group had 19% similar to hCG. It was concluded that deslorelin has a better efficacy producing ovulation than hCG, its time range was narrowed and it has a greater incidence on inducing multiple ovulations.

INTRODUCCION

La inducción de la ovulación se ha convertido en un método de rutina en reproducción equina para obtener el máximo de eficiencia en el uso de padrillos y dosis de semen. Las yeguas muestran una amplia variación individual en la duración del estro y los intervalos ovulatorios, por lo que es de suma importancia la utilización de inductores farmacológicos. Por otro lado el surgimiento de modernas técnicas reproductivas como la transferencia de embriones y la inseminación artificial con semen congelado requieren una precisa predicción del tiempo de ovulación, lo cual avala el uso de estos fármacos. (Kölling, 2005). La Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) ha sido la primera droga usada para inducir la ovulación en yeguas y por el momento es probablemente la más usada mundialmente. La hCG tiene actividad de hormona luteinizante (LH). En yeguas se utiliza principalmente en dosis de 1000 UI. Para inducir la ovulación la hCG se administra cuando es detectado

un folículo ≥ 35mm durante el estro. La ovulación usualmente ocurre dentro de 36-48 horas (65% -70% tasa de ovulación)(Barbacini, 2000). Varios estudios han sido desarrollados en la última década para encontrar alternativas a la hCG, desde que fue demostrado que el uso frecuente de esta hormona produce la formación de anticuerpos anti-hCG, con una subsecuente perdida de la eficacia farmacológica (Barbacini,2000). La vida media de estos anticuerpos puede ser de 30 días a algunos meses después de 2-4 inyecciones de la hormona y, además la reacción cruzada con la hormona luteinizante puede reducir la eficacia del tratamiento y significativamente retrasar o suprimir completamente la ovulación, especialmente en yeguas viejas (Kolling, 2005).Diversas investigaciones llevaron a la creación de un agonista de la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH), la Deslorelina. La ventaja es que su uso repetido no disminuye su eficacia (Berezowski, 2002). La Deslorelina controla la liberación de las gonadotrofinas hipofisiarias como la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por parte de la pituitaria anterior, induciendo la ovulación y estimulando el crecimiento folicular. Debido a que la droga es un análogo de la GnRH aparentemente es más resistente a la degradación que la hormona original, mejorando su actividad biológica. Se han reportado tasas de éxito del 88 al 100% de yeguas que ovularon antes de las 48 horas de administrada, sugiriéndose una mayor eficacia clínica que la hCG en folículos grandes de pared gruesa (Morel, 2005). La Deslorelina inyectable (BioRelease Deslorelin injection) está disponible en un vehículo líquido biocompatible, el cual se administra en una dosis de 0,75 a 1.5 mg por vía intramuscular (Berezowski, 2002). A lo largo de los años se ha comprobado el efecto y características de estos inductores en razas de yeguas Cuarto de Milla y Sangre Pura de Carrera entre otras, pero es muy escasa la información publicada en nuestras razas y realidad geográfica .

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron un total de 1032 ciclos en yeguas Pura Raza Chilena. Para el estudio se conformaron 3 grupos. Es importante dejar claro que los grupos son conformados por ciclos estudiados y no por yeguas. Por lo tanto hay yeguas cuyos ciclos están distribuidos en uno, dos o los tres grupos. Ya que hubo momentos dentro de la misma temporada reproductiva o de una temporada a otra en que se decidía utilizar una hormona o la otra o ninguna según objetivo del ciclo en estudio, tipo de semen a utilizar y disponibilidad en el mercado de la hormona. Además el rango de edad de las yeguas fue entre 3 y 26 años, y las cuales también están distribuidas en forma aleatoria en los tres grupos. Los grupos conformados por ende fueron así: Un primer grupo que no recibió tratamiento alguno (211 ciclos), un segundo grupo que recibió hCG a una dosis de 1500 UI vía endovenosa (Chorulon®/Intervet) (389 ciclos) y un tercer grupo que recibió Deslorelina en dosis de 1ml vía intramuscular (Bio-release Deslorelin/Vetpharma®) (432 ciclos). Ambos grupos tratados recibieron la hormona respectiva cuando un folículo de 35mm se encontraba durante el estro y concomitante a esto existía presencia de edema endometrial grado 2. Las yeguas eran controladas ecográficamente después de esta etapa cada 8, 12 o 24 horas según la ubicación geográfica de estas hasta que se detectaba uno o más cuerpo lúteos lo cual confirmaba la ovulación. Yeguas que ovulaban y aún existía presencia de otro folículo potencialmente ovulatorio seguía bajo control para determinar o no una ovulación múltiple. Por lo tanto se registraron los siguientes datos: 1)tiempo en que se produjo la ovulación desde la aplicación de la hormona para grupos 2 y 3 y desde la presencia de un folículo 35mm para el grupo control no tratado; 2) numero de ciclos anovulatorios y 3) numero de ovulaciones por ciclo. Para el análisis de datos cuantitativos se obtuvo Media, Mediana, Desviación estándar e Intervalos de Confianza al 95%.De lo anterior se obtuvo los datos base para el cálculo de análisis de Varianza.

RESULTADOS

A continuación se presenta una tabla (Tabla N°1) con los resultados obtenidos para cada variable estudiada en cada grupo:

	Tiempo Promedio en Ovular (horas)	Rango de tiempo de acción (horas)
Grupo Control	86[a]	73-108[a]
Grupo hCG	47,5[b]	34-51[b]
Grupo Deslorelina	42,5[b]	36-46[b]

Tabla 1. Tiempo promedio (en horas) entre inducción y ovulación y rango de tiempo de acción. (a-b; p ≤ 0,05)

	Ciclos con Ovulaciones Múltiples (%)	Ciclos con Ovulación Detectada (%)
Grupo Control	19[a]	93[a]
Grupo hCG	21[a]	95[a]
Grupo Deslorelina	31[b]	99[b]

Tabla 2. Ciclos con ovulaciones múltiples y con detección de ovulación. [a-b; p ≤ 0,05)

Se determinó que existe diferencia significativa para el tiempo transcurrido desde la aparición de un folículo de 35mm durante el estro hasta la ovulación entre el grupo control no tratado y ambos grupos tratados con las hormonas respectivas. A pesar de que si existe diferencia entre grupo hCG y Deslorelina, esta es menor que la observada con el grupo control. Los rangos de tiempo de acción obedecen a la misma constante descrita recientemente. Siendo el de Deslorelina el más acotado. El número de ciclos con ovulaciones múltiples es mayor significativamente en el grupo Deslorelina y también es el grupo con casi un 100% de eficacia en generar una ovulación al término del estro.

DISCUSION

Los resultados obtenidos no difieren mucho de los reportados en la bibliografía internacional y corroboran la eficacia, rangos de acción más acotados y mayor incidencia de ovulaciones múltiples de la Deslorelina en comparación con la hCG o grupos no tratados de ovulaciones espontaneas. Además conforman un grupo de resultados que confirman la utilidad con tiempos específicos de acción en la raza pura chilena. Frente a la actual demanda de la industria equina mundial, el uso de eficaces inductores de ovulación asegura el mejor uso de recursos como padrillos y dosis de semen congelado aumentando su eficiencia y resultados.

CONCLUSION

El uso de inductores de ovulación mejora la eficiencia y eficacia del manejo del celo de la yegua para la toma de decisiones como cuando inseminar. Además, en este trabajo, la Deslorelina muestra un rango de acción menor a la hCG y tiene mayor incidencia de producir ovulaciones múltiples a la hora de instaurar un protocolo de transferencia embrionaria en la raza Pura Chilena.

REFERENCIAS

Barbacini, S., 2000. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. Equine Veterinary Education. Volumen 12.

Berezowski, C., Stitch, K., Wendt, K. y Vest, D., 2006.*Clinical Comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares* [en línea]: Betpharm Publications. Disponible en: <http://www.betpharm.com/downloads/COMPAR1.pdf>

Kölling, Michaela y Allen,W.R., 2006. Ovulation induction for embryo transfer: hCG versus GnRH analogue. En: Proceedings of a Workshop on International Equine Gamete Group, Havemeyer Foundation Monograph Series. Newmarket, Reino Unido, International Equine Gametes Group Workshop. No. 18 pp. 54-55.

Morel Davies,M 2005. Fisiología de la Reproducción de los Équidos, Cría y Manejo de la Yeguada. Zaragoza, Capitulo 3: Control endocrino de la reproducción en la yegua.

INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE PARTOS E DO SEXO DO POTRO SOBRE O TEMPO DE GESTAÇÃO NA RAÇA MANGALARGA PAULISTA

Influencia del numero de partos y el sexo del potrillo sobre la duracion gestacional en la raza Mangalarga Marchador

Influence of the maternal parity and foal gender on gestational length in Mangalarga Paulista breed

Meirelles MG[1]; Alonso MA[1]; Guimarães CF[1]; Ferreira J RM[1]; Nichi M[1]; Fernandes CB[1]

[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP – Brasil; Departamento de Reprodução Animal, Av Prof Dr Orlando de Marques Paiva, 87, São Paulo – SP, Brasil; email: fernandescb@usp.br

RESUMEN

Se estudio la duración de la gestación en 90 potrillos de raza Mangalarga Paulista. La media gestacional fue de 345±11.60 días con un rango de 317-404 días. Las gestaciones con potrillos machos fueron significativamente (p<0.05) más largas (347.63±1.88) que las de las potrancas (342.28±1.46), con una diferencia media de 5.35 días. Hubo una correlación negativa entre el número de partos y la duración de la gestación (p=0.0035/r=-0.32). El largo de la gestación fue afectado significativamente por el sexo del potrillo y el número de partos.

RESUME

The length of gestation of 90 Mangalarga Paulista foals was studied. The mean gestational length was 345.02±11.60 days with a range of 317-404 days. Colt foal pregnancies were significantly (p<0.05) longer (347.63±1.88) than fillies (342.28±1.46), with difference of 5.35 days. There was a negative correlation between number of births and gestational length (p=0.0035/r=-0.32). The length of gestation was significantly affected by foal sex and parity.

INTRODUÇÃO

O tempo de gestação é um parâmetro fisiológico de importância clínica e econômica para a indústria eqüina, sendo considerado um critério acurado para determinar viabilidade neonatal e classificar potros dismaturos e prematuros (Koterba, 1990). O manejo de eqüinos de alto valor comercial requer supervisão, consequência de uma previsão do momento do parto evitando riscos para a mãe e o produto (Satué et al.,2011). Notória variação na duração da gestação em éguas de diferentes raças e indivíduos da mesma raça tem sido descrita na literatura. Foi reportado o tempo de gestação para éguas da raça Puro

Sangue Inglês (Davies-Morel et al., 2002; Duggan et al., 2008; Elliot et al., 2009), Quarto-de--Milha (Duggan et al., 2008), Crioulo (Winter et al., 2007), Pantaneira (Zu'ccari et al., 2002), Lusitana (Perez et al., 2003; Valera et al., 2006;) e Árabe (Valera et al. 2006). Em todos esses estudos o tempo médio de gestação variou entre 330 e 350 dias (Satué et al., 2011). Não existem relatos da duração da gestação para a raça Mangalarga Paulista. O objetivo deste estudo foi determinar a variação do tempo de gestação para a raça Mangalarga Paulista e a influência das variáveis, sexo do produto e número de partos, na duração da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos dados de 90 gestações de potros Mangalarga Paulista no período de 2001-2012, avaliando um total de 50 éguas, em um haras localizado em Piracaia – SP (Brasil).

O tempo de gestação foi calculado considerando o dia da ovulação até a data de parto. A análise do efeito do sexo do produto sobre o tempo de gestação foi calculada utilizando o programa SAS System for Windows, considerando um nível de significância de 95% ($p<0.05$). Para avaliar a relação entre as variáveis número de partos e duração da gestação foi utilizado o teste do Coeficiente de Correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração média de gestação de 90 potros da raça Mangalarga Paulista foi de 345.02±11.60, com um intervalo entre 317 a 404 dias. Para a espécie equina, um período gestacional inferior a 320 dias são considerados de risco, podendo resultar no nascimento de potros prematuros ou animais com susceptibilidade a desenvolver doenças na vida adulta (Koterba, 1990). Por outro lado, gestações superiores a 365 dias são raras, com poucos relatos na literatura. West (1994) descreveu a gestação mais longa com 419 dias e o nascimento de um potro viável. Nesse estudo a fêmea nascida com 317 dias de gestação foi clinicamente saudável, já o potro de 404 dias apresentou baixo peso ao nascimento, pobre tônus muscular, reflexo de sucção diminuído, não conseguia mamar na égua e o aleitamento foi realizado por mamadeira nas primeiras 12 horas pós-parto, moderada hiperextensão das articulações metacarpo-falangeana dos membros anteriores e metatarso-falangeana dos membros posteriores, moderada contratura do tendão extensor digital comum nos membros anteriores, dentes incisivos erupcionados, crescimento excessivo dos cascos e cauda longa. Tais achados corroboram com o descrito por Rossdale (1993), caracterizando este potro como pós-maturo. Foi observada diferença significativa ($p= 0,0284$) no tempo médio de gestação entre fêmeas (342.28±1.46) e machos (347.63±1.88), resultando em uma diferença de 5,35 dias (**tabela 1**). Esse dado corrobora com trabalhos prévios (Davies-Morel et al., 2002; Perez et al., 2003; Valera et al., 2006; Satué et al., 2011), os quais observaram que a gestação de potros machos foi mais longa do que de fêmeas. O motivo pelo qual a gestação de machos é mais longa do que a de fêmeas ainda não está bem elucidado. Alguns trabalhos sugerem que esse prolongamento se deve a diferentes ações endócrinas ligadas ao sexo do feto, que interagem de forma distinta para o controle do parto (Jainudeen e Hafez, 2000). Outro argumento seria que potros machos apresentam maior desenvolvimento corpóreo, e desta forma levariam um período mais longo até a formação completa do feto e sinalização para o parto, embora Wilsher e Allen (2002) relataram que fetos machos apresentam uma placenta mais desenvolvida, o que proporcionaria um crescimento mais rápido do potro (Valera et al., 2006). Apesar disso, Elliott et al. (2009) demonstrou que o peso do potro ao nascimento não está fortemente associado ao tempo de gestação (Satué et al.,2011).

Tabela 1: Duração da gestação (média ± erro padrão) de potros da Raça Mangalarga Paulista em função do sexo do produto.

Gênero	N°. Animais	Duração da Gestação ± Erro Padrão
Fêmeas	44	342.28 ± 1.46A
Machos	46	347.63 ± 1.88B

Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05)

Tabela 2: Duração da gestação (média ± erro padrão) de éguas da Raça Mangalarga Paulista em função do número de partos.

N° de Partos	N°. Animais	Duração da Gestação ± Erro Padrão
1	19	353.79 ± 3.52
2	15	346.27 ± 2.46
3	13	340.62 ± 3.37
4	9	337.56 ± 3.00
5	9	344.11 ± 2.25
6	8	342.87 ± 2.27
7	4	343.50 ± 5.04
8	2	342.00 ± 6.00

Neste estudo encontramos uma correlação negativa entre o número de partos e a duração da gestação (p=0.0035/r=-0.32) (**tabela 2**), de acordo com os achados de Pool-Anderson et al. (1994) e Satué et al. (2011). É sugerido que éguas primíparas, que são geralmente jovens, não estão anatomicamente e fisiologicamente preparadas quando comparadas a pluríparas, o que acarretaria em maior tempo de gestação (Valera et al., 2006).

CONCLUSÕES

Observamos que a duração média de gestação de 90 potros viáveis da raça Mangalarga Paulista foi de 345.02±11.60, com intervalo de 317-404 dias. A duração da gestação foi significativamente influenciada pelo sexo do potro e o número de partos. Estes dados demonstram a grande variação do período gestacional de eqüinos, quando comparados a outras espécies, e sua importância clínica, uma vez que permite classificar os animais em prematuros e dismaturos.

REFERÊNCIAS

Davies Morel MCG; Newcombe JR; Holland SJ., 2002. Factors affecting gestation length in the Thoroughbred mare. Anim Reprod Sci. 74, 175-185.

Duggan VE; Holyoak GR; MacAllister CG; Cooper SR, Confer AW., 2008. Amyloid A in equine calostrum and early milk. Vet Immunol Immunopathol. 15, 150-155.

Elliott C; Morton J; Chopin ., 2009. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. Theriogenology. 71, 683-689.

Jainudeen MR; Hafez ESE, 2000. Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez ESE, Hafez B (eds) Reproduction in Farm Animals. Lippincott, Williams and Wilkins, Boston, pp 140-155.

Koterba AM., 1990. Physical examination. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC (eds) Equine Clinical Neonatology, Lea & Febiger, Philadelphia, London, pp 71-83.

Pérez CC; Rodríguez I; Mota J; Dorado J; Hidalgo M; Felipe M; Sanz J, 2003**.** Gestation length in Carthusian Spanishbred mares. Livest Prod Sci. 82, 181-187.

Pool-Anderson K; Raub RH; Warren JA, 1994. Maternal influences on growth and development of full-sibling foals. J Anim Sci. 72, 1661-1666.

Rossdale PD., 1993. Clinical view of disturbances in equine foetal maturation. Equine Vet J Suppl. 14, 3-7.

Satué K; Felipe M; Mota J; Muñoz A., 2011. Gestational length in Carthusian broodmares: effects of breeding season, foal gender, age of mare, year of parturition, parity and sire. Polish Journal of Veterinary Sciences. 14(2), 173-180.

Valera M; Blesa F; Dos Santos R; Molina A, 2006. Genetic study of gestation length in Andalusian and Arabian mares. Anim Reprod Sci. 95, 75-96.

West G,1994. Black's Veterinary Dictionary, BT Limited, Bastford.

Wilsher S; Allen WR, 2002. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. Equine Vet. J. 35, 476–483.

Winter GHZ; Rubin MIB; De la Corte FD; Silva CAM, 2007. Gestational length and first postpartum ovulation of Criollo mares on a stud farm in Southern Brazil. J Equine Vet Sci. 27, 531-534.

Zuccari CESN; Nunes DB; Corre´a Filho RAC, 2002. Reproductive eficiency in Pantaneira mares during breeding season 1995/2000. Arch Zootec. 51, 139-148.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA EM DIFERENTES DOSES ASSOCIADA OU NÃO À PROSTAGLANDINA: RESULTADOS PARCIAIS

Evaluacion de la eficiencia de la Gonadotrofina Corionica Humana en diferentes dosis asociada a prostaglandina: resultados parciales

Evaluation of efficiency of Human Chorionic Gonadotropin in different doses associated or not to prostaglandin: partial results

Paiva SO[1]; Silva PCA; Janella BFS; Junqueira RGC; Siqueira BPR; Jacob JCF[2]

[1]Aluno de Graduação em Medicina Veterinária UFRRJ, bolsista de Iniciação Científica CNPq - email: savinhopaiva@hotmail.com, *[2]Professor do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil, 23.890-000*

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de hCG en diferentes dosis, asociados o no a cloprostenol en la induccion de la ovulación. Un total de 23 ciclos estrales dividido en cuatro grupos: G1 (n = 6) de control de 1 ml de solución salina iv, G2 (n = 6) iv 1000 UI de hCG, IU, G3 (n = 6) 715 UI de hCG, iv, G4 (n = 5) 1.000 UI de hCG iv asociado a 1 ml de cloprostenol 24 horas después de la inducción. El tamaño de los folículos en el momento de la inducción no fue diferente entre los grupos (p> 0,05), sin embargo el tiempo de la ovulación, el tamaño del folículo 6 horas antes de la ovulación y el mayor diámetro folicular fueron significativamente menores (P <0,05) en los grupos tratados . En conclusión, todos los tratamientos fueron eficaces en la promoción de la ovulación y que la asociación con 1 ml de cloprostenol no reduce el intervalo entre la inducción y la ovulación.

RESUME

The present study aimed to evaluate the effectiveness of hCG in different doses, associated or not to cloprostenol in promoting ovulation. A total of 23 estrous cycles divided into four groups: G1 (n = 6) control 1ml iv saline; G2 (n = 6) iv 1000 IU hCG, IU; G3 (n = 6) 715 IU hCG iv, G4 (n = 5) 1000 IU hCG iv associated to 1ml cloprostenol 24 hours after induction. The follicle size at the time of induction did not differ among the groups (p> 0.05), however the time of ovulation, the follicle size 6 hours prior to ovulation and largest follicle diameter were significantly lower (P <0.05) in the treated groups. In conclusion, all treatments were effective in promoting ovulation and that the association with 1ml of cloprostenol did not reduce the interval between ovulation induction.

INTRODUÇÃO

Para otimizar as biotécnicas da reprodução eqüina, o uso de agente indutores da ovulação torna-se necessário, uma vez que não se consegue predizer o momento exato da ovula-

ção, podemos assim estimar na maioria das vezes quando essa ocorrerá. Com isso, pode-se melhorar a eficiência reprodutiva. Alguns hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), mostraram ser eficientes em promover a ovulação (FIGUEIREDO *et al*, 2011). Há uma grande variação nas doses de hCG utilizadas, ficando entre 1500 e 2500 UI (GASTAL *et al*, 2006). No entanto, estudos recentes mostraram que 1000UI de hCG é eficiente em promover a ovulação em éguas de diferentes raças, independente do porte, Mangalarga Marchador (JACOB *et al*, 2011) e Bretão Postier (SILVA *et al*, 2011). Sabe-se que o processo ovulatório depende de interações entre o LH e o AMPcíclico, prostaglandinas e enzimas proteolíticas (GINTHER, 1992). Estudos recentes evidenciaram a interação das prostaglandinas nesse processo, uma vez que a aplicação de fármacos antiinflamatórios, que por sua vez são inibidores de prostaglandinas, mostrou ser eficiente em inibir a ovulação (CUERVO-ARANGO; DOMINGO--ORTIZ, 2011). Sendo assim, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a eficiência em promover a ovulação, ao utilizar doses mais baixas do que as tradicionalmente utilizadas de hCG e a associação de um análogo de prostaglandina com a dose comumente utilizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 23 ciclos estrais de éguas da raça Mangalarga Marchador, em idade reprodutiva, com boa condição corporal e mantidas a pasto, distribuídos em quatro grupos experimentais sendo: G1 (Controle, n=6), 1 ml i.v. Solução Salina; G2 (n=6), 1000 UI i.v. hCG - Vetecor®; G3 (n=6), 715 UI i.v. hCG - Vetecor®; G4 (n=5) 1000UI i.v. hCG - Vetecor® associado com 1 ml cloprostenol (Sincrocio®) 24 horas após a aplicação do hCG. O controle folicular foi feito diariamente através de palpação retal e ultrassonografia, até a detecção de um folículo ≥ 35mm de diâmetro e presença de edema uterino. Nesse momento, as éguas foram induzidas de acordo com o grupo experimental. Após 24 horas da indução da ovulação, o acompanhamento folicular foi realisado a cada 6 horas até a detecção da ovulação. Os dados foram analisados utilizando o Teste de Tukey com índice de significância de 5%.

RESULTADOS

Todas as éguas tratadas ovularam em um intervalo de 36 a 48 horas após a indução da ovulação, enquanto que o grupo controle as ovulações ocorreram entre 48 e 114 horas. Os resultados das avaliações foliculares estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Avaliação do diâmetro do folículo no momento da indução, ovulações em até 48 horas, intervalo da indução à ovulação, diâmetro do maior folículo e do folículo pré-ovulatório.

Grupo	N	Diâmetro folículo induzido (mm)	Ovulações em até 48 horas (%)	Intervalo da indução à ovulação (h)	Maior diâmetro folicular (mm)	Diâmetro do folículo 6 horas da ovulação (mm)
G1	6	36,42±0,49a	16,7a	76±24,49a	44,75±2,18a	43,91±1,74a
G2	6	36±1,22a	100b	40±4,89b	38,16±2,96b	37,08±2,51b
G3	6	36±0,89a	100b	38±3,09b	38,83±1,36b	38,25±1,57b
G4	5	36,6±1,47a	100b	37,2±2,68b	38,9±2,58b	38,4±2,55b

DISCUSSÃO

No presente estudo não houve diferença no diâmetro médio dos folículos no momento da indução entre os grupos (p>0,05). Já as médias do intervalo do tratamento à ovulação foram maiores no grupo controle (p≤0,05) quando comparado com os grupos tratados, no entanto, esses não diferiram entre si (p>0,05). Esses resultados corroboram com Silva *et al.* (2011) que trabalhando com 1000UI de hCG, as ovulações ocorreram em média 38,7±4,3h, para o grupo tratado e 105±18,09h no grupo controle (p≤0,05). A média do maior diâmetro folicular também foi inferior (p≤0,05) nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al* (2011), onde para o grupo tratado e controle obtiveram 39,1±1,6 e 48,3±2,7mm, respectivamente. Já o diâmetro dos folículos 6 horas antes da ovulação foi menor (p≤0,05) nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Estando de acordo com Gastal *et al* (2006), que verificaram para os grupos tratados com 2500UI e 1500UI, médias de 38,3±0,3; 39,1±0,4mm, respectivamente, sendo menor (p<0,0001) que o grupo controle (44,9±0,4mm).

CONCLUSÕES

A utilização dos agentes indutores foram eficientes em promover a ovulação em até 48 horas, encurtando em quase 2 dias o período de estro das éguas, o que é desejado dentro de um programa de transferência de embriões. O tratamento com 715 UI mostrou ser equivalente ao de 1000 UI atualmente utilizado. Mesmo sabendo da participação direta da prostaglandina no processo de ovulação, a administração de um análogo de prostaglandina 24 horas após a indução não promoveu efeito significativo na redução do tempo de ovulação quando comparado aos outros dois tratamentos.

AGRADECIMENTOS: Agradecimentos ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

Cuervo-Arango, J.; Domingo-Ortiz, R 2011. Systemic treatment with high dose of flunixin meglumine is able to block ovulation in mares by inducing haemorrhage and luteinisation of follicles. Theriogenology v. 75, p. 707–714.

Figueiredo,T.; Paiva, R.; Kozicki, L.E.; Kaercher, F.; Weiss, R.R.;Santos, I.W.; Muradas, P.R. 2011. Induction of Ovulation in Quarter Horse Mares through the Use of Deslorelin Acetate and Human Chorionic Gonadotrophin (hCG). Brazilian archives of biology and technology. v. 54, p. 517-521.

Gastal, E.L.; Silva, L.A.; Gastal, M.O.; Evans, M.J. 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. Animal Reproduction Science, v.94, p. 186-190.

Ginther, O. J.1992. Reproductive biology of the mare. 2ª Ed. Wisconsin: Equiservices, p. 503-509.

Jacob, J. C. F.; Santos, G. O.; Sá, M. A. F.; Oliveira, J. P. 2011. Uso clínico de HCG em um programa de transferência de embriões equino: mitos e verdades. A Hora Veterinária, v. 180, p. 9-12.

Silva, P.C.A; Sá, M.A.F.; Bezerra, L.L.; Gramático, C.M.O.; Paiva, S.O.; Jacob, J.C.F. 2011. Respuesta ovulatoria de yeguas Breton Postier tratadas con gonadrotofina corionica humana. Resúmenes del II Congreso Argentino de Reproducción Equina, p. 589-591.

Ginecología # 13

DETERMINACION DEL SEXO FETAL EQUINO POR ULTRASONOGRAFIA TRANSRECTAL A LOS 120 DIAS DE GESTACION

Equine fetal gender determination by trasnsrectal ultrasonography at 120 days of gestation

Ramírez HA[1]; Wunder MT[2]

[1]Flor de Azucenas 112 D.111, Las Condes, Santiago, Chile, 56-9-92704708 hernanramirez@bioteq.cl*[2] Reina Victoria 6120, La Reina, Santiago, Chile. Centro de Medicina Reproductiva Equina, BIOTEQ, Chile.*

RESUME

The present study wanted to prove the efficacy of determining fetal gender in mares at 120 days of gestation. A total of 357 pregnancies were transrectaly scanned. After location of either the fetal head, heart, thorax or stomach the probe was moved towards the posterior abdomen to reach the gonads. Once the gonads were located, an image was frozen for evaluation. Ovaries appear with a double zone. An external homogeneous area called cortex and an internal same aspect zone called medulla. Both separated by a thin anecoic line. Testicules looked completely homogeneous all over the gonad and a hiperecoic line was observed along the longitudinal middle axis of the organ. A total of 168 male scans and 189 female scans were obtained by examination of the fetal gonads. Once mares foaled or aborted 168 foals were confirmed and 188 fillies out of 189. This single mare was scanned at 104 days of gestation because of transportation to a far away geographical area. It was concluded that scanning mare's gestations at 120 days is an optimal way to diagnose fetal gender with no errors or false diagnosing, and does not require much experience from the veterinarian.

INTRODUCCION

En las últimas dos décadas ha sido común la práctica de establecer el sexo del feto en las gestaciones equinas con el fin de ordenar futuros manejos dentro de un haras, estrategia comercial de ventas o como servicio gratificante para sus propietarios. Comúnmente este examen se ha efectuado durante una ventana estrecha de tiempo entre los 60 y70 días de gestación y logrando imágenes ecográficas poco claras debido al pequeño tamaño de los tubérculos genitales y por ende con un alto potencial de falsos positivos. En los últimos 10 años se ha implementado una nueva técnica para ecografiar los fetos entre los 100 y 150 días de gestación. Durante esta ventana de tiempo las gónadas de los fetos son muy grandes en proporción al tamaño corporal total del feto. Esto genera imágenes muy claras entre testículos y ovarios y por lo tanto la disminución total de falsos diagnósticos. Además no requiere de experiencia por parte del operador ya que las imágenes a visualizar son notorias y distintas entre macho y hembra.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio fue efectuado por el Centro de Medicina Reproductiva Equina, BIOTEQ, entre Noviembre del año 2010 y Diciembre del año 2012. Se examinaron un total de 357 gestaciones en yeguas pura raza Chilena (189), Sangre Pura de Carrera (108) y Pura Raza Árabe (60). A diciembre del 2012,346 yeguas parieron y hubo un total de 11 abortos los cuales también fueron controlados por sexo del feto abortado. Las yeguas fueron ecografiadas a los 120 días de gestación. Los diagnósticos de sexaje fetal dudoso se repitieron 5 días más tarde con 125 días de gestación. Solo 14 yeguas fueron ecografiadas antes de los 120 días de gestación por razones de movimiento geográfico de las yeguas. Las yeguas era ubicadas dentro de una manga y se utilizó un equipo de ultrasonido Sonosite Micromaxx con sonda lineal transrectal a una frecuencia de escaneo de 5Mhz.Previo vaciamiento del recto de material fecal se introducía la sonda por el recto en busca del útero grávido y de la imagen fetal. Se ubicaban las regiones del feto como cabeza, tórax, corazón o estómago para luego desplazarse con el transductor hacia la zona abdominal posterior. Las gónadas fetales se encuentran ocupando la mayoría de la región posterior del abdomen dado su tamaño en este tiempo comparado con el tamaño corporal fetal. Imágenes de órganos abdominales que ayudaban a ubicar las gónadas son estómago y las asas intestinales. Los cuales se sitúan hacia craneal de las gónadas fetales. Una vez ubicadas las gónadas se grababa una imagen en el equipo de ultrasonido para su inmediato análisis. En caso de ser ovarios estos se observaban como una imagen ovoide caracterizada por dos zonas ecográficamente demarcadas entre ellas dentro de la gónada. Una zona externa homogénea y ecoica que reconocemos como la cortical del órgano y una zona central también homogénea y ecoica que reconocemos como la medula del órgano. Ambas separadas por una delgada línea anecoica. En caso de ser testículos, la imagen también ovoide de la gónada demostraba un patrón de imagen también homogéneo y ecoico pero en la totalidad del órgano. Además se observa una línea hiperecoica central que recorre el eje longitudinal del órgano y que reconocemos como el mediastino testicular.

RESULTADOS

De un total de 357 gestaciones controladas por ecografía, 343 fueron controladas a los 120 días de gestación y 14 gestaciones entre 102 y 111 días de gestación. Del total de partos (346) y abortos (11) controlados se confirmaron 168 machos y 189 hembras. Para los machos obtenidos la eficacia de determinación de sexo fetal fue de un 100% (168 de 168). De la misma forma las hembras obtuvieron un porcentaje de eficacia de 99,5% (188 de 189). El rango de tiempo requerido para efectuar el diagnóstico posterior al vaciamiento rectal fue entre 10 y 90 segundos con un promedio de 35 segundos entre las razas estudiadas.

DISCUSION

Posiblemente la gestación que fue sexada como hembra y resulto ser macho al nacimiento se debió a que el sexaje fetal fue a los 102 días de gestación y en condiciones de indocilidad y carente de una manga de examinación. Se debe considerar además que a los 102 días de gestación el tamaño de las gónadas fetales es menor. Además se recomienda no examinar por sexaje fetal muy cerca de los 150 días ya que en la mayoría de los casos el feto crece mucho y se aleja del alcance de la mano del operador o por lo menos dificulta y demora más el proceso. Se recomienda también que las yeguas de razas chilena y árabes sean examinadas con este fin en lo posible desde los 125 días de gestación por el tamaño de los fetos para facilitar el sexaje fetal. Las yeguas Fina Sangre de Carrera mostraron una menor

dificultad de sexaje y sin importar mucho si tenían cumplido o no los 125 días de gestación. Es importante también considerar que el reconocer si una gónada es ovario o testículo es fácil, es crucial que las condiciones de examinación de la yegua gestante sean tranquilas y seguras. Eso afectará directamente en la calidad y reducido tiempo de manejo y ecografía del ejemplar en cuestión.

CONCLUSIONES

Se concluye que la técnica empleada en el periodo gestacional propuesto para determinar sexo fetal en equinos es altamente eficaz y de rápida realización. No produce falsos positivos al examen alrededor de los 120 días de gestación. El rango propuesto permite re-examinar yeguas por sexajes dudosos o controles sin diagnóstico claro con mayor holgura que el periodo de 60 a 70 días de gestación. No necesita de mayor experiencia por parte del operador.

REFERENCIAS

Bucca S., 2005.Equine Fetal Gender Determination from Mid to Advance Gestation by Ultrasound. Theriogenology, 64, 568-571.

Curran S., Ginther OJ., 1989. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercule. J Equine Vet Sci, 9, 77-83.

Gaetano M., 2002. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. Theriogenology, 58, 1237-1243.

Holder RD., 2001. Fetal Sex Determination in the Mare Between 55 and 150 Days Gestation:46th Annual AAEP Convention Proceedings, 321-32.

COMPARAÇÃO DA IRRIGAÇÃO FOLICULAR DE ÉGUAS JOVENS E IDOSAS NO MOMENTO DA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO – RESULTADOS PARCIAIS

Comparación de la irrigación folicular en yeguas jóvenes y viejas al momento de la inducción de ovulación. Resultados preliminares

Comparison of follicular irrigation of young and older mares at the time of ovulation induction – partial results

***Resende HL*[1]; Canesin HS[1]; Ramires-Neto C[1]; Pantoja JCF[2]; Silva LA[3]; Alvarenga MA[1]**

[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. E-mail: helene_resende@hotmail.com, Telefone/fax: +55 14 3880-2119. [2]Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. [3]Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), USP – Univ de São Paulo, Campus Pirassununga, SP, Brasil. Laboratório de Teriogenologia

RESUMEN

La irrigación del folículo preovulatorio en las yeguas se han correlacionado con la tasa de preñez, una vez que los folículos preovulatorios con mayor irrigación son responsables de mejores tasas de preñez. El objetivo de este estudio fue comparar la perfusión vascular del ovario y folicular en yeguas jóvenes y viejas, en el momento de la inducción de la ovulación. Para esto, se utilizaron 12 yeguas, divididas en dos grupos: yeguas jóvenes (n=6), 3-8 años de edad y yeguas viejas (n=6), mayores de 18 años de edad. Los animales se observaron diariamente mediante ecografía transrectal, y cuando se detecto un folículo ≥ 35 mm de diámetro, se llevó a cabo la evaluación de la irrigación folicular ovárica y la perfusión vascular por ultrasonido Doppler. Luego, la ovulación se indujo con 1 mg de acetato de deslorelina. Se utilizo um modelos para medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) para comparar las variables (RI, PI y SUB) entre los grupos. El nivel de significación estadística se estableció como 0,05. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en PI (P = 0,13), RI (p = 0,10) y el análisis subjetivo de los folículos (P = 0,25) entre yeguas jóvenes y viejas.

RESUME

The irrigation of the preovulatory follicle in horses have been correlated with the pregnancy rate, once that the preovulatory follicles most irrigated are responsible for better pregnancy rates. The aim of this study is to compare the ovarian vascular perfusion and follicular irrigation of young and old mares, at the time of ovulation induction. For this, 12 mares were used, divided into two groups: young mares (n = 6), 3-8 years and older mares (n = 6), above 18 years of age. The animals were observed daily by transrectal ultrasound, when it has detected a follicle ≥ 35 mm in diameter, was conducted the evaluation of the follicular irrigation and ovarian vascular perfusion by ultrasound

Doppler. Then, ovulation was induced with 1 mg of deslorelin acetate. Models for repeated measures (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) were used to compare the variables (RI, PI and SUB) between the groups. The level of statistical significance was set as 0.05. There was no statistically difference in PI (P = 0.13), RI (P = 0.10) and subjective analysis of the follicle (P = 0.25) between young and old mares.

INTRODUÇÃO

O plantel de equinos em atividade reprodutiva é composto por uma grande parte de animais idosos em função da lentidão do melhoramento genético nesta espécie. Os baixos índices de gestação encontrados em um plantel se devem, especialmente, à baixa fertilidade dos animais idosos. Vários fatores são potenciais causadores da infertilidade ou subfertilidade em éguas idosas, e as alterações anatômicas do sistema reprodutivo e inviabilidade oocitária são os mais citados. Éguas senis apresentam com frequência falhas na maturação folicular, sendo esta a principal causa da não viabilidade do oócito (Carnevale & Ginther, 1995). A ultrassonografia Doppler é uma ferramenta recente, que surgiu como alternativa para a avaliação folicular. Esta técnica permite a avaliação em tempo real da perfusão vascular de órgãos e tecidos, o que resulta em importantes informações morfofuncionais da estrutura avaliada. A perfusão vascular do folículo pré-ovulatório e a taxa de gestação têm sido correlacionadas em equinos, sendo os folículos que apresentaram maior vascularização, responsáveis por melhores índices de gestação (Silva et al., 2006). Em um estudo realizado por Silva et al. (2006), quando realizada a análise retrospectiva da perfusão vascular folicular, as éguas que obtiveram diagnóstico de gestação negativo, haviam apresentado menor irrigação do folículo pré-ovulatório, enquanto os animais que se tornaram gestantes, haviam apresentado intensa vascularização. Ao avaliar a perfusão vascular de folículos dominantes ovulatórios e anovulatórios durante o período de transição, Acosta et al. (2004), observaram que os folículos ovulatórios de 30 mm de diâmetro apresentaram o dobro da vascularização, quando comparados à folículos anovulatórios de mesmo diâmetro. O objetivo do presente estudo foi comparar a perfusão vascular ovariana e irrigação folicular de éguas jovens e idosas, no momento da indução da ovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido durante a estação reprodutiva 2012/2013, na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Foram utilizadas 12 éguas mestiças, separadas em dois grupos: éguas jovens (n=6), com idade entre 3 e 8 anos, e éguas idosas (n=6), com idade acima de 18 anos. Os animais foram acompanhados por meio da ultrassonografia transretal modo B, utilizando o ultrassom com probe linear multifrequencial (MyLab™Five – ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Itália). Quando detectado um folículo ≥35 mm de diâmetro, realizou-se a avaliação folicular por ultrassonografia Color Doppler. A irrigação folicular foi estimada subjetivamente e em tempo real pela porcentagem (0 a 100%) da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos, em planos de duas dimensões, considerando todo o folículo. O transdutor foi posicionado em vários ângulos para obter a posição com maior número de sinais Doppler coloridos na parede folicular (Silva et al., 2006). Para avaliação da perfusão vascular ovariana, coletou-se os dados em modo espectral Doppler na artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório. Para tanto, posicionou-se o cursor no pedículo ovariano, sendo gerados três gráficos de ciclos cardíacos subsequentes, para que, a partir de um deles, fossem obtidos os Índices de Resistência (RI) e de Pulstailidade (PI) da artéria ovariana (Bollwein et al., 2002). Após a avaliação ultrassonográfica, foi realizado o tratamento para indução da ovulação com 1mg

de acetato de deslorelina (BET Pharm, Lexington, KY – EUA), por via intramuscular. Todas as éguas ovularam entre 36 e 48 horas após o tratamento. Modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foram utilizados para comparar as variáveis resposta (RI, PI e SUB) entre os grupos. Uma estrutura de covariância de simetria composta foi usada para modelar a correlação entre as medidas múltiplas dentro da mesma égua. O nível de significância estatística foi definido como 0,05.

RESULTADOS

Não houve diferença estatística do PI (*P*=0,13), RI (*P*=0,10) e análise subjetiva do folículo pré-ovulatório (*P*=0,25) entre éguas jovens e idosas.

Tabela 1. Média ±SEM da irrigação folicular (SUB) e índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) da artéria ovariana ipsilateral ao folículo pré-ovulatório.

Grupo	SUB (%)	RI	PI
Jovens	29,16±10,68	0,71±0,05	1,40±0,18
Idosas	20,83±12,81	0,77±0,06	1,63±0,30

DISCUSSÃO

Até o presente momento, não foram encontrados outros estudos comparando a irrigação folicular de éguas jovens e idosas, por meio da análise subjetiva da irrigação local, e objetiva da perfusão vascular ovariana. Em estudo realizado por Acosta et al. (2004), os folículos que ovularam, apresentavam maior irrigação, quando comparados aos anovulatórios. Neste trabalho, não houve diferença estatística, uma vez que todos os folículos ovularam no tempo previsto. Não foi encontrada diferença significante entre os dois grupos, no entanto foi encontrada uma tendência no índice de resistência (*P*=0,10). Tal achado pode ser devido ao pequeno número de animais em cada grupo. Os resultados aqui apresentados são apenas parciais, espera-se que, ao concluir o trabalho, e assim aumentar o número de animais, sejam encontrados resultados mais conclusivos.

CONCLUSÃO

Não foram encontradas diferenças na perfusão vascular ovariana e irrigação folicular entre éguas jovens e idosas, quando os folículos apresentaram diâmetro de aproximadamente 35 mm. No entanto, muitos fatores estão envolvidos na regulação da hemodinâmica ovariana, e poucos os aspectos já foram elucidados quando se comparam éguas de diferentes idades, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão e aplicabilidade a campo dos resultados até agora encontrados.

AGRADECIMENTOS: À FAPESP, pelo suporte financeiro e pela concessão da Bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS

Acosta T.J.; Beg M.A.; Ginther O.J., 2004. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. Biology of Reproduction. 71, 637–642.

Bollwein H.; Weber F.; Kolberg B.; Stolla R., 2002. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. Theriogenology. 65, 2129-2138.

Carnevale E. M.; Ginther O.J., 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol. Reprod. Monogr. 1, 209–214.

Silva L.A.; Gastal E.L.; Gastal M.O.; Beg M.A.; Ginther O.J., 2006. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. Animal Reproduction. 3, 339-346.

INFLUENCE OF hCG ON PROGESTERONE PRODUCTION IN MARES

Influencia de la hCG sobre la produccion de progesterona en yeguas

***Romano RM*[1]; *Ferreira JC*[1]; *Canesin HS*[1];*Ignácio FS*[1]; *Novaes Filho LF*[1]; *Barros AMR*[2]; *Meira C*[1]**

*[1]Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Botucatu, SP, Brasil, Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970. [2]Centro Universitário Anhanguera – Leme, SP, Brasil. *55 14 81292208, e-mail: rafa_mromano@yahoo.com.br*

RESUMEN

La Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) tiene una actividad biológica similar a la LH y una acción luteotropa, y se usa comúnmente como un agente inductor de la ovulación. Se ha investigado sobre su papel en la formación y desarrollo del cuerpo lúteo (CL) y también sobre la progesterona plasmática (P4). El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de hCG en la función secretora del CL de las yeguas durante el diestro temprano. Cuando el folículo mayor alcanzó ≥ 35mm y edema uterino evidente, las yeguas fueron distribuidos en el grupo control (0,9% de NaCl 1 ml, iv) y el grupo de hCG (hCG2500 IU, iv). Las muestras de sangre se recolectaron diariamente de D0 a D8 para determinar la concentración plasmática de P4. La técnica utilizada para medir la concentración de P4 fue radioinmunoensayo. Para el análisis estadístico, la prueba F se utilizó para determinar la prueba t. La prueba t para varianzas equivalentes se utilizó para probar la hipótesis de igualdad entre las variables. No hubo efecto de grupo (P> 0,1) para la concentración plasmática de P4. En ambos grupos un aumento progresivo y similar de la concentración plasmática de P4 se detectó a partir de D0 a D8 (P <0,001). Los resultados de este estudio demostraron que la función secretora temprana y de la mitad del ciclo del cuerpo lúteo no se ve afectada por el tratamiento inductor de la ovulación con 2500 UI de hCG.

INTRODUCTION

In all domestic species, the continuous secretion of P4 is required for maintenance of pregnancy (Short, 1969). P4 production during early gestation is performed by the primary CL and the Luteinizing Hormone (LH) is the principal responsible for luteogenesis and functionality of CL (Niswender et al., 2000). Hcg is a glycoprotein that has a subunit similar to LH. Therefore, hCG has a LH-like biological activity and luteotrophic action, promoting ovulation and development of corpus luteum (Newcombe, 2011). Currently, this glycoprotein has been used as an ovulation inducing agent and treatment with 2500 IU of mares with a preovulatory follicle is commonly usedin the field (Ginther et al., 2009). Because of the biological activity similar to LH, recent studies have evaluated the effect of hCG on the formation and development of CL and also on plasma P4 production. However, conflicting effects of hCG on luteogenesis have been described. In vivo and in vitro studies demonstrated a positive relationship between treatment with hCG and P4 produc-

tion (Kelly etal., 1988; Fleury et al., 2007), while Urquieta et al., (2009) reported no influence of hCG on the plasma P4 concentration. Thus, influence of hCG on plasmaP4 concentration through administration at different times of the estrous cycle is unknown until the present moment. The aims of the present study were a) to describe the plasma progesterone concentration of mares treated or not with hCG for ovulation induction; and b) to evaluate hCG influence on secretory function of the corpus luteum of mares during early diestrus.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted during the reproductive season(October, 2010 to February 2011), in the Southern Hemisphere (22°52'20"S). Mares (n=12) were housed at Equine Reproduction Center (CERBEQ) of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ-UNESP, Brazil. Follicles ≥25mm were scanned daily using B-mode ultrasound for follicular development monitoring. When the largest follicle reached ≥35mm associated with evident uterine edema, mares were randomly distributed into two groups (n=6 mares/ group) according to treatment: Control (0.9% NaCl 1mL) and hCG(hCG2500 IU) groups. The treatment was done intravenously. Day of ovulation was considered day 0 (D0). Blood samples were collected into heparinized evacuated tubes once a day from D0 to D8 to determine plasma P4 concentration. The technique used to measure the plasma P4 concentration was radioimmunoassay (Coat-a-count progesterone Kit, Diagnostic Product Corporation, DPC; Bergfeld and Ginther, 1986). The intra-assay coefficient of variation and sensitivity of assay were respectively 7.6±0.7% and 0.05 ng/mL. For statistical analysis F-test was used to determine the t-test. The t-test for equivalent variances was used to testthe hypothesis of equality between variables. Differences between groups within time were reported using probability of P≤0.05 to indicate significance. Data are presented as mean±S.E.M.

RESULTS

All mares treated with hCG ovulated between 36 and 42 hours after treatment (mean 41.0±1.0 hours). In Control group the mean time between treatment and ovulation was 105.6±14.4 hours (range 72 to 144 h).No effect of group (*P*>0.1) was observed for plasma P4 concentration. In both groups a progressively and similar increase of plasma P4 concentration was detected from D0 to D8 (P<0.001). Data are presented as mean±S.E.M on Table 1.

Table 1. Mean±S.E.M plasma progesterone concentration during early diestrus of mares treated with hCG or saline solution, at time of ovulation induction.

Day (D0 = day of ovulation)	Plasma Progesterone Concentration (ng/mL)	
	hCGGroup	ControlGroup
D0	0.55 ± 0.14	0.49 ± 0.05
D1	1.64 ± 0.31	2.65 ± 0.55
D2	3.68 ± 0.73	5.61 ± 0.74
D3	6,37 ± 1.02	8.64 ± 0.56
D4	9.17 ± 1.53	12.65 ± 1.35
D5	10.24 ± 0.93	13.99 ± 1.93
D6	11.43 ± 1.08	15.03 ± 2.07
D7	11.11 ± 1.55	16.79 ± 3.34
D8	9.35 ± 0.80	15.37 ± 2.91

No statistical difference was detected between evaluated groups within the moments (p = 0.27).

DISCUSSION

Our findings confirmed that there was no effect of ovulation inducing treatment with 2500 IU of hCG on functional status of young and mature CLs. Additionally, the anticipation of the increase in plasma P4 levels previously reported (Fleury et al., 2007) was not detected on the present study. Apparently, the use of a high dose of hCG for ovulation induction may be an unnecessary cost, considering there is no influence of 2500 IU of hCG on the luteal secretory function and the efficiency of low doses of hCG for ovulation induction (Gastal et al., 2006). According to Kelly et al. (1988), hCG treatment during early diestrus enhanced the functional status of the CL from D7 to D14. It is possible that hCG treatment in distinct stages of the estrus cycle affects the CL lifespan and, consequently, the synthesis of P4. Therefore, studies from our laboratory are been finalized to determine in what manner the moment of treatment with hCG can affect luteal parameters.

CONCLUSION

The findings of this study demonstrated that secretory function of early and midcycle corpus luteum is not affected by ovulation inducing treatment with 2500 IU of hCG.

ACKNOWLEDGEMENT: This research was supported by FAPESP, Brazil.

REFERENCES

Bergfelt DR; Ginther OJ, 1986.Follicular populations following inhibition of follicular stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mare.Theriogenology. 26, 733-747.

Fleury PDC; Alonso MA; Sousa FAC;Andrade AFC;Arruda RP. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. Revista Brasileira deReprodruçãoAnimal, 31,27-31.

Gastal EL; Silva LA; Gastal MO; Evans MJ. 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares, Animal Reproduction Science, 94, 186 -190.

Ginther OJ; Beg MA; Gastal EL; Gastal MO; Cooper DA. 2009. Treatment with human chorionic gonadrotrophin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17β estradiol decrease and more rapid LH increase in mares. Animal Reproduction Science, 114, 311–317.

Kelly CM; Hoyer PB; Wise ME. 1988. In vitro and In vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotropin stimulation. Journal of Reproduction and Fertility, 84, 593-600.

Newcombe JR; Human Chorionic Gonadotropin: in Equine Reproduction, 2ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p. McKinnon AO; Squires EL; Vaala WE; Varner DD.

Niswender GD; Juengel JL; Silva PJ; Rollyson MK; Mcintush EW.2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiology Reviews, 80, 1–29.

Short RV.1969. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: Ciba Foundation Symposium Foetal Autonomy.2–26.

Urquieta B; Duran MC; Coloma I; Parraguez VH. 2009. hCG induced ovulation in Thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. Reproduction Domestic Animals, 44, 859-864.

Ginecología # 16

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PRIMEIRO ESTRO PÓS-PARTO EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA EM DIFERENTES IDADES

Evaluacion de la eficiencia del primer estro post-parto en yeguas de raza Criolla de diferentes edades

Efficiency rates or first post-partum oestrus on Criollo mares from different ages

***Severo GM*[1]; Schmitt FL[2]; Antunes TE[3]; Centena LC[4]; Nobre GO.[5]**

[1] Acadêmico em Medicina Veterinária- FV/UFPel; gilberto.severo@hotmail.com, *(53)99478233; [2] Médico Veterinário Autônomo; kikols@ig.com.br, (51)92421338; [3] Acadêmica em Medicina Veterinária- FV/UFPel;* escobar_219@hotmail.com,(53)81211831*; [4]Acadêmico em Medicina Veterinária- FV/ULBRA,* lucianocentena@terra.com.br,(51)96939544*; [5]Médico Veterinário Autônomo; goliveiranobre@hotmail.com(53)99581044*

RESUMEN

The Criollo breed is growing and uses of reproductive techniques that improve the pregnancy rates are increasingly. The use of the first postpartum estrus in mares of different ages can be a practice to reduce foaling intervals. The objective of this study was to compare the efficiency of foal heat at different mare ages. The results show that mares 15 years have good reproductive performance in foal heat. But the stress of foaling, weight loss can have a negative influence on pregnancy rates.

INTRODUÇÃO

A indústria eqüina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. Como todas as espécies domésticas, os eqüinos apresentam algumas peculiaridades no que diz respeito ao sistema reprodutivo, como baixo índice de fertilidade e de prolificidade (SULLIVAN et al,1975; VOSS,1993). No Brasil, a raça Crioula passa por um período de grande valorização dos animais e crescente utilização das técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões, não possuindo muitos trabalhos específicos da raça. O presente trabalho busca identificar a eficiência da utilização do primeiro cio pós-parto, em éguas de diferentes idades, como prática para melhorar o desempenho reprodutivo e redução de intervalos entre partos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na cidade de Camaquã, Rio Grande do Sul, Brasil, durante a temporada reprodutiva de outubro de 2011 à março de 2012, com o objetivo de

avaliar a eficiência do cio do potro em éguas da raça Crioula. Foram avaliadas 73 éguas paridas com idade entre 6 e 20 anos que foram mantidas em campo nativo, não recebendo nenhuma suplementação e parindo entre os meses de outubro de 2011 à janeiro de 2012. Foram divididos dois grupos conforme idade, sendo 60 éguas no grupo 1, com menos de 15 anos, e 13 éguas no grupo 2, com mais de 15 anos. O controle folicular foi efetuado através de palpação retal e ultrassonografia a partir do 5° dia após o parto e inseminadas com sêmen resfriado à 15°C de diferentes garanhões e de fertilidade provada, sendo os ejaculados avaliados a cada coleta. O controle foi realizado com intervalos de 48 horas até o dia da ovulação para identificação do primeiro estro pós-parto. O momento da cobertura foi determinado pelo tamanho e flutuação folicular e edema uterino, caso necessário à ovulação era o induzida com gonadotrofina coriônica humana (hCG). O diagnóstico de prenhez era realizado com 15 dias pós-ovulação e após confirmação eram acompanhadas quinzenalmente, até 45 dias pós-ovulação. Foi realizada a análise Qui Quadrado para avaliar a estatística de prenhez em cada grupo e análise de variância One Way para o intervalo parto/ovulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1- Relação entre éguas prenhes após cio do potro em relação às idades

GRUPO	n	Prenhes	%
1	60	38/60	63,33%
2	13	3/13	23,07%
Total	73	41/73	56,16

Após avaliação, o grupo 1 apresentou 63,33% de éguas prenhes, e o grupo 2 23,07% de éguas prenhes no primeiro cio pós parto no final da temporada de monta. A média de dias identificada entre o parto e a primeira ovulação do grupo 1 foi de 16,9 ±7,7 dias, desvio padrão (sd). Já no grupo 2, a média de dias para ocorrência do cio do potro foi de 18,2 ±9,7 sd. Estatisticamente não ocorreu diferença dos dias de intervalo parto/ovulação entre os grupos, pois p=0,64 (p<0,05). Na comparação entre o grupo 1, éguas com menos de 15 anos, e grupo 2, éguas com mais de 15 anos, também não houve diferença estatística em relação as taxas de prenhez, sendo p=0,1.Neste lote de 41 éguas prenhes a comparação demonstrou que as éguas com menos de 15 anos foram mais eficientes na taxa de prenhez no primeiro cio pó-parto. Segundo Morris e Allen (2002) que avaliaram éguas da raça Puro Sangue Inglês com mais e menos de 13 anos, onde as jovens apresentaram 61,95% de taxa de prenhes e as mais velhas 50,7%, o aumento da idade está associado com a redução da competência reprodutiva. Causas dessa redução não estão completamente entendidas, porém alguns autores indicam alterações uterinas e ovarianas como fatores importantes, ocorrendo em éguas de idade avançada, relacionadas também com o número de partos (RICKETS & ALLONSO, 1991; NEWCOMBE, 2000).

CONCLUSÃO

A utilização do primeiro cio pós parto mostrou-se eficiente para melhoria da taxa de prenhez, principalmente nas éguas com menos de 15 anos. Porém cuidados com manejo, estresse e alimentação são determinantes para um bom aproveitamento do primeiro estro pós parto. Com o crescimento e valorização da raça crioula, a utilização das técnicas de reprodução são indispensáveis para a eficiência da criação.

REFERÊNCIAS

Peres, K. R.; et al 2006. Utilização do primeiro ciclo ovulatório da estação reprodutiva para produção de embriões em éguas sob condições tropicais

Morris, L.H.A.; Allen, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. Equine Veterinary Journal, v.34, i.1, p.51, 2002.

Newcombe, J.R. Embryonic loss and abnormalitiesof pregnancy. Equine Veterinary Education, v.12, p.88- 101, 2000.

Ricketts, S.W., Alonso, S. The effect of age and parity on the development of chronic endometrial disease. Equine Veterinary Journal, v.23, p.189-192, 1991.

Winter, G. H. Z.; 2007. Características Reprodutivas Sazonais da Égua Crioula em uma Propriedade à Latitude 29º38'S no Rio Grande do Sul.

APLICACIÓN DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DE CORDON UMBILICAL COMO INFUSION INTRAUTERINA EN UNA YEGUA PURA RAZA CHILENA. REPORTE CLINICO

Application of umbilical cord Mesenchymal stem cells as an infusion in the uterus of a Chilean Purebred mare. Clinical report

Wunder MT[1]; Ramírez HA[2];Domeyko C[3]; Erices A[3]

[1]Reina Victoria 6120, La Reina, Santiago, Chile[2]Flor de Azucenas 112 D.111, Las Condes, Santiago, Chile, 56-9-92704708 hernanramirez@bioteq.cl.*Centro de Medicina Reproductiva Equina, BIOTEQ, Chile, [3]Eduardo Marquina 3937 Oficina 407, Vitacura, Santiago, Chile, VitaStemCel, Chile.*

RESUME

The present case report wanted to test the effect of a mesenchymal stem cells infusion harvested from umbilical cord of a newborn foal into the uterus of a 23 year old Chilean purebred mare with a grade IIB biopsy score endometriosis. The goal was to test if after this treatment the inflammation and degeneration degree of the endometrium could be improved. A total of 20 million stem cells were infused in 60 milliliters of saline solution into the uterus during estrous. A biopsy sample and uterine cytology was taken before the infusion and 22 days after it for evaluation and comparison. Cytology before the infusion showed severe inflammation that was significatively reduced afterwards. The biopsy shifted from a IIB score to a mild IIA score according to Kenney and Doig. It was concluded that this kind of therapy can help in uterine health but additional studies are required in order to confirm the real role of stem cells on the improvement of uterine health and to analyze the different options for treatments with this kind of cells respect to doses and frequency.

INTRODUCCION

Las células madre mesenquimales son células indiferenciadas y multipotentes capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares y su función ha sido asociada, entre otras, a la reparación de injurias tisulares. Estas células han sido cultivadas *in vitro* y han originado tecnologías avanzadas para su uso en diversas terapias. Estas células cultivadas y expandidas *in vitro* tienen propiedades inmunoreguladoras y de reparación. En general estas células se han obtenido de médula ósea y tejido adiposo para su uso en lesiones tendinosas y articulares en equinos. En las últimas tres décadas los intentos por encontrar terapias nuevas para endometritis y endometriosis en la yegua, causas más comunes de infertilidad en la yegua, han sido variadas. Una seria de terapias de antibióticos, lavajes uterinos, uso de fármacos ecbólicos, correcciones quirúrgicas, infusiones de plasma entre otros han sido la batería de tratamientos. Todos ellos enfocados hacia lograr la resolución de los cuadros de endometritis. Pero que ocurre cuando el cuadro clínico uterino ya está en una etapa irreversible y degenerativa como ocurre en la endometriosis? En el presente caso se obtuvieron células de cordón umbilical como alternativa a las de tejido adiposo y medula ósea

para estudiar por un lado su efectividad y características y por otro lado tener un acceso a este tipo de células en una época del año donde se concentran los partos y por una vía no invasiva como lo es la obtención desde tejido adiposo y médula ósea.

MATERIALES Y METODOS

El presente caso clínico fue abordado por el Centro de Medicina Reproductiva Equina, BIOTEQ. Se seleccionó una yegua pura raza chilena de 23 años de edad y multípara cuya historia reproductiva data de infertilidad hace 4 años. Al primer examen reproductivo efectuado, la yegua presentaba un útero con abundante fluido intraluminal tanto en cuernos como cuerpo uterino. El aspecto del líquido al ultrasonido era ecoico (gris). Ambos ovarios presentaban actividad cíclica normal con presencia de un cuerpo lúteo. Se procedió a tomar muestras para cultivo y citología así como una biopsia endometrial. No existían biopsias previas. Al examen vaginoscópico y conformación perineal la yegua no presentaba alteraciones. Finalmente fue inducida con prostaglandinas (cloprostenol) para comenzar la terapia durante el estro .Al quinto día posterior a la aplicación de cloprostenol, la yegua en su 2° día de estro, fue sometida a 3 lavajes uterinos, durante tres días consecutivos, con solución de ringer lactato para evacuar el fluido acumulado. Se percató que la yegua ya en celo no relajaba el cérvix y al examen digital no existía presencia de adherencias. Se aplicaron dos infusiones intrauterinas de ceftiofur (ChemieCeft®) en dosis de 1000mg totales en 50 ml de agua bidestilada estéril después del tercer lavaje con solución de ringer lactato y por dos días consecutivos. La yegua ovuló normalmente al término del estro y fue inducida al 6° día nuevamente con cloprostenol para que en el siguiente ciclo se tratara con la infusión de células madres mesenquimales. Tres semanas antes se obtuvo una muestra de 10cm de longitud de la porción media del cordón umbilical de un potrillo recién nacido. Dicha muestra fue enviada al laboratorio VitaStemCel donde fue preparada y expandida para la multiplicación de células madre mesenquimales alogénicas. Las células fueron utilizadas luego del segundo cultivo y caracterizadas sobre la base de su capacidad de adhesión y proliferación, morfología fibroblastoide y capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico y adipogénico. En el siguiente estro, la yegua mostró un acumulo de fluido leve en el útero y de aspecto anecóico, limitándose a no más de 2 cm lineales en la base del cuerno derecho. Se repitió el hisopado a nivel endometrial para cultivo y citología. Durante el 4° día de celo se aplicó la infusión intrauterina de 20 millones de células madres mesenquimales de cordón umbilical suspendidas en solución PBS. La yegua fue controlada al siguiente día por ecografía y el útero se observaba sin alteraciones o reacciones a la infusión de células. La yegua ovuló 48 horas después. Se esperó un tiempo de 15 días desde la ovulación, un diestro completo, para control ecográfico. La yegua entró en celo al día 18 post ovulación alargando el diestro. El 4° día se repitieron las muestras para cultivo y citología y esta vez también la biopsia endometrial.

RESULTADOS

Las primeras muestras tomadas arrojaron una infección con *Escherichia coli* y alto número de neutrófilos tóxicos. El resultado de la biopsia endometrial arrojo una graduación IIB según Kenney y Doig observándose lesiones degenerativas como glándulas quísticas (2 x campo 40X), fibrosis periglandular de hasta 5 capas de fibroblastos y lagunas linfáticas (1 x campo 40X). Además se observaba en sectores pérdida de epitelio o éste estaba pleomórfico con un marcado infiltrado inflamatorio en el estrato compacto. Los resultados del segundo hisopado endometrial fueron negativos para el cultivo y la citología aun presentaba una inflamación moderada, con presencia de PMN. Después de la infusión de células

y esperando un diestro completo, los cuatro primeros días del estro la imagen ultrasonográfica del útero no presentaba alteración alguna. El cultivo volvió a aparecer negativo y la citología no presentaba neutrófilos. La biopsia mostró una mejoría en el grado o score clasificándose como IIA pero con la particularidad de ser una IIA leve. La biopsia fue leída por tres personas entrenadas y se coincidió en la categoría de clasificación. Solo se observó cómo lesión degenerativa algunas glándulas quísticas (1 por campo 40X) y el marcado infiltrado inflamatorio de la primera biopsia no estaba presente. Además se observó un epitelio integro. Las pocas lagunas linfáticas de la primer biopsia no se observaron en la segunda así como tampoco fibrosis periglandular. Nidos glandulares no se observaron en ninguna instancia. La yegua a la fecha de envío de este reporte clínico ha sido inseminada dos veces con semen refrigerado a dosis de 800 millones de espermatozoides con motilidad progresiva con el fin de lograr una gestación en ella. No se ha logrado dicha gestación pero en ambos ciclos y controles post inseminación no se ha observado el útero inflamado, ni con acumulo de fluido intraluminal.

DISCUSION

Se observó en forma clara y con testimonio principal de la biopsia endometrial que la calidad o graduación uterina mejoro después de la infusión con células madre mesenquimáticas alogénicas de cordón umbilical. Del mismo modo los controles clínicos reproductivos mediante ultrasonografía demostraron que el útero mejoro su aspecto y reacciones frente al semen y en cada celo que la yegua ha sido re examinada. Se cree que la razón por la cual la yegua sigue vacía, pese a dos intentos de I.A, puede corresponder a otros factores como senescencia gamética, patología oviductal o simplemente que aún faltan estudios para confirmar que protocolo de infusión de células madres es el más adecuado en cuanto a dosis, frecuencia o ritmo horario. Además es importante considerar también la fuente (tejido) por la cual se obtienen las células y evaluar si tiene o no implicancia en cuanto al efecto futuro que pueda producir en el útero. No menos importante, a considerar es el tiempo apropiado de descanso espera posterior a la implantación o infusión de estas células en el útero, debido a que ellas necesitan actuar y reparar lesiones a nivel endometrial. Esto estará directamente ligado también al grado de injuria o lesiones y por ende al grado de clasificación de biopsia de cada útero. Sin duda se abre una ventana de posibilidades que seguramente terminará en protocolos adecuados y precisos para alargar la vida de muchas yeguas seniles reproductivamente, su posibilidad de gestar o simplemente alargar su vida reproductiva en programas de transferencia embrionaria. Nuestro laboratorio y equipo de trabajo se encuentra actualmente trabajando con otras yeguas para aclarar estas interrogantes. Finalmente es importante considerar también su aplicación en cuadros crónicos de endometritis para lograr una inmunoregulación de factores inflamatorios, sirviendo como complemento a las terapias ya conocidas por todos.

CONCLUSIONES

Se concluye que el protocolo utilizado logró mejorar, tanto clínicamente como en su calidad de biopsia endometrial, las lesiones encontradas a nivel uterino. Además es importante recalcar la abolición del cuadro inflamatorio y la no recidiva de este en los siguientes dos ciclos estrales. Importante considerar si la aplicación de lavajes uterinos y antibióticos intrauterinos como complemento del tratamiento. La utilización de células mesenquimales alogénicas de cordón umbilical tiene efectos inmunoreguladores y regenerativos y son una fuente no invasiva de este tipo de células y las cuales pueden ser obtenida en época de partos, debidamente expandidas y almacenadas en nitrógeno líquido en laboratorio.

REFERENCIAS

Kenney RM. 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. J Am Vet Med Assoc., 172:241-62.

Mambelli L.I. 2012. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. Theriogenology, 1-7.

Schmidt A., 2012. Application of stem cells in Orthopedics. Stem cells Int. 2012:1-11

Ehnert S. 2009. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality?. Langebeck´s Archives of Surgery; 394:987-97.

Alvarenga M., 2012. Treatment of mares with chronic uterine injury using stem cells obtained from bone marrow. Reproduction on Domestic Animals, abstract 3152, p.582.

Carrade D., 2010. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogenic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. Cytotherapy, Early Online, 1-12.

ESTUDO DA VIABILIDADE DA CASTRAÇÃO QUÍMICA EM GARANHÕES

Estudio de viabilidad de la castracion química em padrillos

Viability of chemical castration in stallions

***Alves LP*[1]*; Oliveira GA[2]; Dau SL[3]; Canto JI[1]; Fiala Rechsteiner S[4]**

*[1]Professor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) – UPF; [2]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária da FAMV – UPF; [3]Residente em Clínica e Patologia dos Animais de Produção da FAMV- UPF;[4]HistorepProfessora Adjunta do Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia –UFPel;*Endereço: Campus I, BR 285 CEP: 99052-900 Bairro São José – Passo Fundo, RS, Brasil, 55 54 33168485/ 55 54 33168163 E-mail: alveslp@upf.br*

RESUMEN

La orquiectomía es uno de los procedimientos quirúrgicos más frecuentes y puede tener complicaciones. Se han desarrollado estudios con el objetivo de encontrar técnicas menos invasivas como la castración química. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de una sola inyección intratesticular de una solución de cloruro de sodio como método de castración en el caballo. Se utilizaron 4 padrillos clínicamente sanos con edades entre 2 y 3 anos. En uno de los testículos se administró entre 70 y 120 ml de cloruro de sodio 0.9% distribuidos por todo el parénquima. En el testículo opuesto no se realizó ninguna aplicación, sirviendo como control. Luego del procedimiento, los animales fueron evaluados respecto a su comportamiento y signos de dolor, calor y tumor. Treinta a sesenta días post inyección se removieron los testículos. Los fragmentos fueron procesados histológicamente y evaluados microscópicamente para ver los cambios en el parénquima testicular. La inyección intratesticular del cloruro de sodio no interrumpe la espermatogénesis. El tamaño testicular disminuyo clínicamente en 15 días, en todos los caballos. Fue observada una intensa reacción tisular en uno de los animales.

RESUME

The surgical procedure called orchiectomy is one of the most frequently performed and there may be complications of the surgery. Studies are developed in order to find less invasive techniques, such as chemical castration. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a single intratesticular injection of sodium chloride as a method of castration. We used four stallions, clinically healthy, aged between 2 and 3 years old. In one testis was administered between 70 and 120 ml of sodium chloride 0.9%, distributed throughout the parenchyma. In the opposite testis any application was not made, serving as control. After the procedure, the animals were evaluated with respect to their behavior and postoperative signs of pain, heat and tumor. Thirty to sixty days after the administration of sodium chloride, the animals were subjected to removal testis. The fragments were processed and subsequently were observed under an optical microscope, verifying histological features, seeking changes in the testicular parenchyma. The intratesticular injection of sodium chloride did not inter-

rupt spermatogenesis. The testicular size decreased in 15 day clinical follow in all horses. Intense tissue reaction was observed in only one animal.

INTRODUÇÃO

O procedimento cirúrgico denominado orquiectomia é um dos mais realizados por profissionais de medicina veterinária podendo ocorrer complicações decorrentes da cirurgia. Diante disso, estudos são desenvolvidos com o propósito de encontrar técnicas menos invasivas, como a castração química. Esta técnica se baseia na administração intratesticular de agentes com capacidade de causar danos irreparáveis como, a perda funcional do órgão. Estudos sobre castração química já foram realizados em diferentes espécies, especialmente cães, utilizando como agentes esclerosantes diferentes concentrações de cloreto férrico, sulfato ferroso, danazol, zinco, glicerol, glicose, solução salina, ácido lático, formalina, permanganato de potássio, cloreto de cadmo, e cloreto de cálcio. Entretanto, pode-se afirmar que as pesquisas envolvendo esterilização química de machos são limitadas, isto talvez se deva aos resultados obtidos com a maioria dos agentes esclerosantes, que não resultam em azoospermia e provocam irritação ou ulceração da bolsa testicular (Oliveira et al., 2007). Recentes pesquisas em equinos envolvem a imunocastração, através do uso da vacina de GnRH, que diminui a produção de espermatozoides e reduz o comportamento agressivo de garanhões. Contudo, mesmo com resultados promissores esta não elimina totalmente o comportamento de garanhão e não implica em completa esterilização, além do custo elevado (Stout, Colenbrander, 2011). Devido à escassez de trabalhos sobre castração química em equinos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma única injeção intratesticular de cloreto de sódio como método de castração.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro garanhões, clinicamente saudáveis, três sem raça definida e um PSI, com idade variando entre 2 e 3 anos de idade. Precedendo à anestesia, foram realizadas avaliações clínica e laboratorial dos animais. Em seguida, os animais foram submetidos à anestesia geral injetável e antissepsia. Em dois animais foi selecionado o testículo esquerdo e em outros dois cavalos o testículo direito (ao acaso), sendo administrado entre 70 e 120 ml de cloreto de sódio 0,9%, distribuídos em todo parênquima testicular, Para a administração do cloreto de sódio foram utilizadas seringas de 60 ml, e agulhas 40x16mm. No testículo controle não foi feita nenhuma aplicação. Após o procedimento, os animais foram avaliados com relação ao seu comportamento pós-operatório e sinais de dor, calor e tumor, sendo descritos esses achados em fichas individuais. Trinta a sessenta dias após a administração do cloreto de sódio, os animais foram submetidos à remoção testicular através da técnica cirúrgica aberta, uma vez que aos 30 dias a espermatogênese não havia sido completada e aos 60 dias as células presentes teriam ou não sido afetadas. Após a orquiectomia, os dois testículos coletados (tratado e controle) foram lavados em solução salina a 0,9% e, imediatamente, seccionados em três porções (proximal, médio e distal), com cortes transversais, dos quais foram extraídos os fragmentos para análise histológica. Cada fragmento testicular foi colocado individualmente em frasco contendo solução de *Bouin*. Os fragmentos foram processados e posteriormente foram observados em microscópio óptico, verificando-se as características histológicas, buscando alterações do parênquima testicular. No aumento de 400x foram contados 100 túbulos seminíferos e destes se verificou a proporção dos que apresentavam espermatozoides na luz.

RESULTADOS

Todos os animais apresentaram redução no volume testicular, após o tratamento, a qual chegou a 60% no testículo injetado com a solução salina. Posteriormente os testículos começaram a aumentar de tamanho, voltando no final do período experimental ao tamanho inicial.Nenhum dos animais apresentou rubor ou tumor na região da bolsa testicular. Calor foi observado na primeira semana em somente um cavalo. Além disso, um paciente apresentou sensibilidade à palpação da bolsa testicular durante os 15 dias de acompanhamento clínico. Com relação à manifestação de dor, todos os animais apresentaram parâmetros fisiológicos sem alterações. Somente o Cavalo 1 apresentou discreto desconforto (Tabela 1), no inicio do tratamento, estabilizando no decorrer dos dias subsequentes.

Tabela 1: Média dos parâmetros fisiológicos avaliados durante 15 dias, após a aplicação intratesticular de cloreto de sódio 0,9%.

Cavalo	FC	FR	ToC
1	50,7	18,4	38,0
2	43,2	16,1	37,8
3	41,2	15,7	37,7
4	43,0	16,2	37,8

Legenda: FC=frequência cardíaca, FR=frequência respiratória, ToC=temperatura em graus Celsius

O referido animal apresentou este desconforto provavelmente devido à reação inflamatória que ocorreu após a aplicação, também verificada no momento da orquiectomia, momento em que foi observada intensa aderência no testículo e túnicas. Com relação à presença de espermatozoides no lúmen tubular não foi observado uma redução de espermatozoides nos testículos tratados em comparação com os testículos controle (Tabela 2).

Tabela 2: Número de espermatozoides presentes no lúmen tubular no estádio VIII do ciclo do epitélio seminífero

Cavalo	Testículo tratado	Testículo controle
1	56	64
2	75	59
3	57	72

DISCUSSÃO

Ao acompanhar os parâmetros de frequência cardíaca, respiratória e temperatura corporal durante 15 dias, aparentemente apenas um animal apresentou dor após a aplicação intratesticular do cloreto. Entretanto, outro animal apresentou parâmetros dentro do intervalo de normalidade e apresentava sensibilidade à palpação na região da bolsa testicular. Embora o número de espermatozoides observado no exame histopatológico não tenha indicado a eficácia do tratamento intratesticular com cloreto de sódio, na avaliação macroscópica a solução provocou reação nos tecidos, evidenciado por aderências encontradas no momento da orquiectomia. O tratamento inicial com cloreto de sódio indicou que concentrações maiores devem ser usadas até chegar a uma concentração ideal capaz de interromper a espermatogênese.

CONCLUSÕES

A injeção intratesticular de cloreto de sódio a 0,9% não interrompeu a espermatogênese. O tamanho testicular diminuiu nos 15 dias de acompanhamento clinico em todos os cavalos. Intensa reação tecidual foi observada em somente um dos animais.

REFERENCIAS

Oliveira EC; Moura MR; Silva VA Jr; Peixoto CA; Saraiva KL; de Sá MJ; Douglas RH; de Pinho Marques A Jr., 2007 Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. Theriogenology, 68, 3, 137-145.

Stout, TAE.;Colenbrander, B. Immunocastration, 2011. En: McKinnon, A; Squires, EL; Vaala, WE; Varner, DD (Eds.) Equine Reproduction. Second edition. Blackwell PublishingLtd, pp. 1191-1196.

PLANT EXTRACTS AS ADDITIVES IN EXTENDER FOR COOLED STALLION SEMEN

Extractos vegetales como aditivos en diluyentes para semen refrigerado equino

Bustamante-Filho IC*[1*]*; Davolli GM*[2]*; Camozzato GC*[2]*; Bastos HBA*[2]*; Maciel AC; Mattos RC*[2]*; Gerhardt A*[1]*; Mallmann R*[1]*; Oliveira JB*[1]*; Ethurn EM*[1]*.

*[1]Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Brazil. [2] REPROLAB, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*Tel.: +55 51 98827197. Email: ivanbustamante@univates.br. Address for correspondence: Av. Avelino Talini, 171, Prédio 7, Sala 217. Lajeado, RS, Brazil. 95900-000*

RESUMEN

Los extractos de plantas son bien conocidos por sus propiedades multifuncionales tales como potencial antioxidante, actividades antimicrobianas y moduladores de la función celular por fitohormonas. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la adición del aceite esencial de Myrrhinium atropurpureum Schott a semen refrigerado equino. Once eyaculados se utilizaron para el experimento, y las diferentes concentraciones del aceite esencial se ensayaron a lo largo de 24 horas de almacenamiento. Los compuestos más abundantes en el aceite esencial fueron 1,8-cineol (37,37%); terpinoleno (19,18%), α-pineno (7,78%). Las concentraciones entre 1 a 0,01% (v / v) fueron espermicidas. No se verificaron influencias en los parámetros espermaticos en concentraciones por debajo de 0,001%. Dado que las concentraciones más bajas son inocuos para la calidad del semen, nuevas investigaciones se están realizando para determinar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial M. atropurpureum con el objetivo de sustituir los antimicrobianos comerciales.

INTRODUCTION

Cooled-shipped semen is a routine method in horse breeding management; however, when stored over more than 24 h at 5°C, sperm motion characteristics decline significantly (Jasko et al., 1992). Loss of motility and fertilizing ability has in part been attributed to lipid peroxidation of the sperm plasma membrane caused by the generation of reactive oxygen species during cold storage. Drugs of natural origin play a major role in the treatment of many diseases and as may lead structures for the development of new synthetic drug substances. Essential oils are natural antioxidants extracted from plants containing primary phenolic agents with reduction capacity; thus, show a positive effect on sperm viability (Malo et al., 2011). Also, some plant oil extracts have antimicrobial properties, which can be used with advantages such as reduced drug resistance. The objective of this study was to evaluate the influence of *Myrrhinium atropurpureum* Schott essential oil in stallion semen cooled at 5°C.

MATERIAL AND METHODS

Essential oil was obtained by hydrodistillation of leaves from *Myrrhinium atropurpureum* Schott using a rotaevaporator. After boiling, vapor was collected and treated with Na_2SO_4 for water removal and stored at -20°C until use. The composition essential oil was assessed by means of gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) in a Varian 3400 (Varian, USA).

For semen assay, eleven ejaculates from four stallions were used for cooling at 5°C using INRA-96 (IMV Technologies, France) as extender with or without essential oil. Semen was collected with an artificial vagina (Hannover model, Minitube, Germany) on an estrous mare. After collection, the gel fraction was removed and semen was filtered through sterile gauze. Ejaculates were analyzed and extended to a final concentration of 50 $x10^6$ sptz/mL. To evaluate the effect of the *M. atropurpureum* essential oil, five concentrations (v/v) were tested: 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.0001%. Samples without essential oil were used as negative control. The following parameters were evaluated: total and progressive motility, sperm membrane integrity (CFDA+PI) and sperm membrane functionality (HOST). Data were analyzed by repeated measures ANOVA with Bonferroni as post-test, with a significance of 5%.

RESULTS

Nineteen different compounds were separated by GC-MS (figure 1) and 17 identified. Three compounds represented 64.33% of the oil composition: 1,8-Cineol (37.37%); Terpinolene (19.18%); α-Pinene (7.78%).

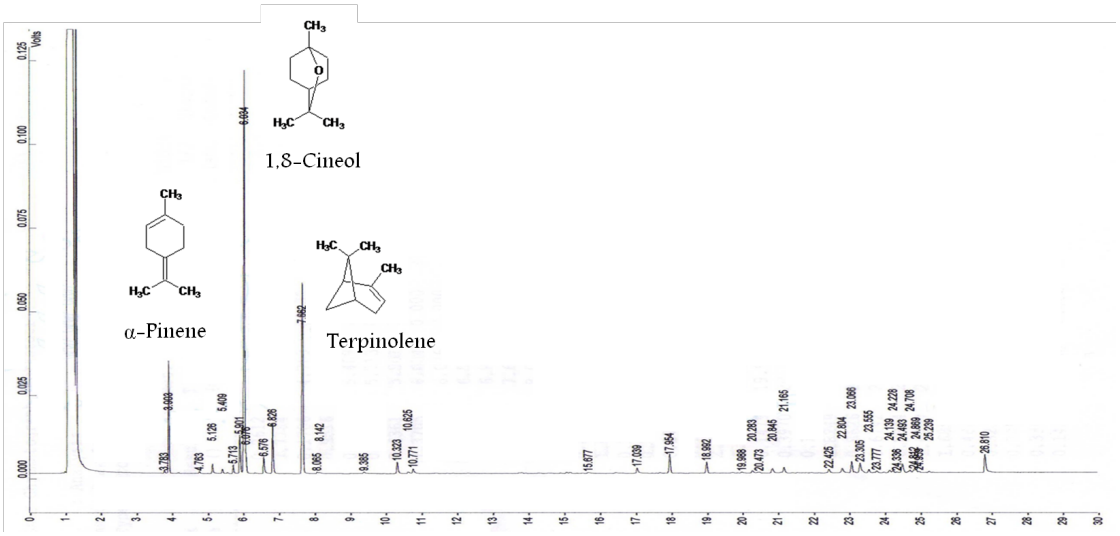


Figure 1 – Chromatogram of the essential oil of *M. atropurpureum* **Schott. The three most abundant molecules are identified.**

A spermicidal effect of *M. atropurpureum* essential oil was observed when extender with 1%, 0.1% and 0.01 % (data not shown) of oil was used. However, no differences were observed between the lower concentrations (0.001 to 0.0001%) and the negative control (figure 2).

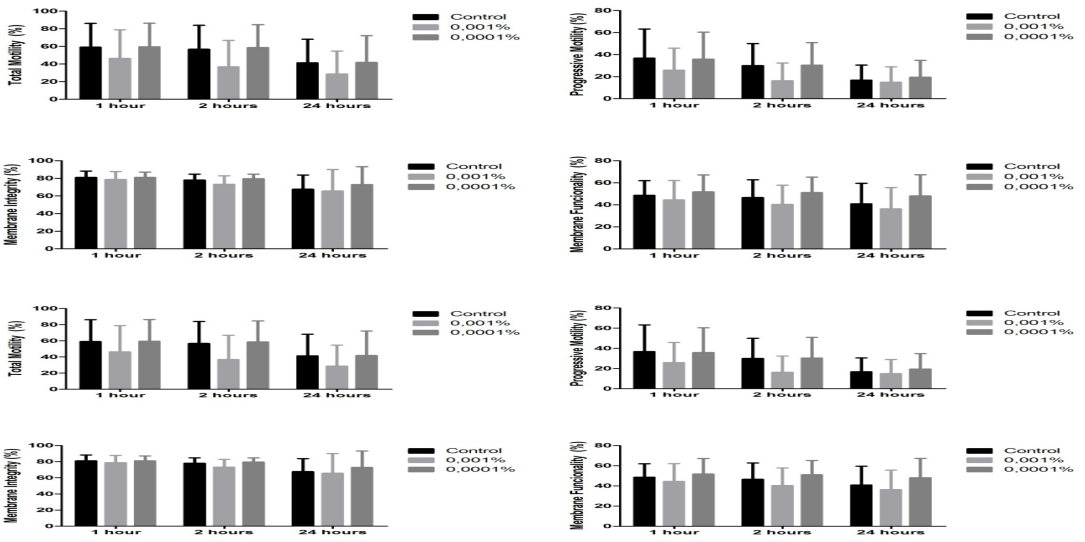


Figure 2 - Seminal parameters of stallion semen preserved with or without *M. atropurpureum* **Schott essential oil.**

DISCUSSION

The present results show that concentrations under 0.001% of *M. atropurpureum* essential oil in semen extender do not affect sperm quality in vitro. Although a beneficial effect on sperm quality during cold storage was not observed, this data is important to permit further experiments to assess the antimicrobial properties of the *M. atropurpureum* essential oil in semen doses. The most abundant compounds found in the essential oil are known to have antimicrobial efficacy (Hendry et al., 2009). Use of commercial antimicrobial in cooled and frozen semen is questioned due to inconsistency in the literature. Jasko et al. (1993) observed that a gentamicin concentration greater than 1 mg/ml in extender can be detrimental to sperm motility after preservation at 5°C. Also, Aurich and Spergser (2007) described a negative effect of gentamicin on sperm function in extended semen during cooled storage and also that optimal concentrations should be tested for each extender type. On the other hand, Varner et al. (1998) reported that use of skim milk extender for semen cooling containing either gentamicin or amikacin had better sperm motility. Therefore, other antimicrobial additives to extenders like plant extracts may be a valuable tool in semen technology.

CONCLUSIONS

The addition of *M. atropurpureum* essential oil in semen extender under a concentration of 0.001% does not affect sperm quality in vitro. Further research is being undertaking to determine the potential of this essential oil as a antimicrobial in stallion semen extender.

FINANCIAL SUPPORT: This research was funded by CNPq and FAPERGS. INRA extenders were kindly provided by Guy Delhomme from IMV - Technologies.

REFERENCES

Aurich C; Spergser J., 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. Theriogenology 67, 912-918.

Hendry ER; Worthington T; Conway BR; Lambert PA., 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. J. Antimicrob. Ther. 64 – 1219-1225.

Jasko DJ; Bedford SJ; Cook NL; Mumford EL; Squires EL; Pickett BW., 1993 Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology. 40, 885-893.

Jasko DJ; Hathaway JA; Schaltenbrand JL, Simper WD, Squires EL., 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology, 37, 1241–1252.

Malo C; Gil L; Cano R; Martínez F; Galé I., 2011. Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75, 1735–1741.

Varner DD; Scanlan CM; Thompson JA; Brumbaugh BW; Blanchard TL; Carlton CM; Johnson L., 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. Theriogenology. 50, 559-573.

UTILIZAÇÃO DE LEITE UHT SEMIDESNATADO E INTEGRAL COMO ALTERNATIVA DE DILUENTE PARA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO RESFRIADO

Utilizacion de leche UHT semidescremada y entera como alternativa de diluyente para conservacion de semen equino refrigerado

Use of UHT semi- skim milk and integral milk as an alternative extender for equine cooled semen

***Castro FS*[1]; Mattos RC[2] ; Fiala Rechsteiner S[3]**

[1] Mestranda PPGMAE – UFRGS, [2]Coordenador do Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos UFRGS - REPROLAB[3] Professora adjunta –HISTOREP- Departamento de Morfologia - IB/UFPel, fscfab@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue verificar la viabilidad del semen equino refrigerado utilizando leche UHT entera y semi-descremada, en comparación con la leche descremada como diluyentes. Fueron utilizados 33 eyaculados de 3 padrillos. Las muestras seminales fueron diluidas en leche UHT entera y semidescremada y leche descremada no UHT, en relación 3:1. Luego de la dilución, fueron estimados la motilidad y vigor espermáticos e integridad funcional de membrana en muestras de semen refrigeradas a 5^{0}C luego de 24 y 48 horas. NO se observaron diferencias significativas entre diluyentes, en relación a motilidad espermática (p=0.9880), vigor (p=0.7249), integridad de membrana (p=0.3382) y funcionalidad de membrana (p>0.01). Basados en estos resultados es posible afirmar que cuando no se encuentra disponible leche descremada corriente, la leche UHT entera o semidescremada puede ser utilizada dado que no produce disminución en los parámetros espermáticos en semen refrigerado por 48 hs.

RESUME

The objective of this study was to verify the viability of using UHT integral milk and semi-skim milk extenders to equine cooled semen. Thirty-three ejaculates from 3 stallions were used. Semen samples were diluted in UHT integral milk, semi and skim milk (3:1). After dilution sperm motility and vigor, membrane integrity and sperm membrane functionality analysis were performed and repeated in samples cooled to 5^{0}C after 24 and 48h. No difference was observed between the diluents, regarding to sperm motility (p = 0.9880), vigor (p = 0.7249), membrane integrity (p = 0.3382) and membrane functionality (p> 0.01). Based on these results it can be stated that when skim milk is not available, UHT semi-skim milk and integral milk can be used, since they do not cause decrease in sperm quality when compared skim milk in equine cooled semen for up to 48 hours.

INTRODUÇÃO

Na preservação do sêmen, é fundamental a presença de diluentes para prolongar a sobrevida dos espermatozóides e protegê-los contra condições ambientais desfavoráveis, como temperaturas extremas (Pickett and Amann, 1987). A escolha do diluente deve ser feita com base no intervalo entre a coleta e a inseminação (Sieme *et al*., 1997) e também nas características individuais do animal, pois nenhum diluente é ideal para todos os garanhões (Province *et al*., 1984). O leite é um dos ingredientes mais utilizados em diluentes de sêmen eqüino (Ebertus, 1963). Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do leite integral e semi-desnatado como diluentes de sêmen equino resfriado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 3 garanhões, com idade entre 3 a 11 anos, pertencentes a Faculdade de Veterinária da UFRGS. A alimentação foi composta por pastagem natural e suplementação com concentrado a base de aveia. Foram realizadas 11 coletas de cada garanhão durante 2 meses na estação reprodutiva de 2012.As coletas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Hannover.O sêmen fresco foi analisado quanto aspecto, volume, concentração, motilidade (0 a 100%), vigor (0 a 5) e morfologia espermática pelo método de Cerovski.. Após este exame amostras de sêmen foram diluídas, com leite UHT integral(3% de gordura), semidesnatado (2% de gordura) e desnatado (0% de gordura), numa proporção de 3:1.O sêmen diluído foi analisado quanto a motilidade, vigor, funcionalidade de membrana em microscopia de fluorescência com CFDA/PI e integridade de membrana através de teste hiposmótico logo após a diluição (0 hora). 24h e 48h após resfriamento em Equitainer. A analise estatística foi realizada através de estatística descritiva e analise de variância (ANOVA). O teste utilizado para comparação de médias foi DMS (Diferença mínima significativa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite é um dos ingredientes mais utilizados como diluente de sêmen, e sua utilização é bastante antiga (Hoffmann, 1905).Não foi observada diferença significativa entre os diluentes, quanto motilidade espermática ($p=0.9880$), vigor ($p=0.7249$), integridade de membrana ($p=0.3382$) e funcionalidade de membrana ($p > 0.01$) (Tabela 1). Com o decorrer o tempo houve uma diminuição ($P<0,01$) da qualidade do sêmen armazenado, comprovada em todas as analises realizadas, independente do diluente utilizado. O sêmen equino pode ser utilizado quando resfriado, uma vez que o resfriamento melhora a longevidade do espermatozoide, através da redução na utilização das reservas de ATP, possibilitando que o ejaculado seja utilizado por longos períodos após sua coleta (Varner*et al*., 1988).

Tabela 1. Média e desvio padrão observados no semen equino resfriado com diferentes tipos de leite

Diluentes	Motilidade	Vigor	Funcionalidade de membrana	Integridade de membrana
Desnatado 0h	65.5±21.1	2.3±0.7	77.2±12.3	48.9±7.7
Semi-desnatado 0h	63.4±20.0	2.1±0.7	76.4±9.5	47.0±6.5
Integral 0h	64.3±21.7	2.1±0.7	74.6±10.5	47.0±8.6
Desnatado 24h	41.6±24.5	1.7±0.8	70.5±10.6	35.8±7.6
Semi-desnatado 24h	40.6±26.8	1.7±0.8	68.0±11.2	34.6±8.6
Integral 24h	41.3±25.3	1.6±0.8	65.8±12.1	35.5±8.4
Desnatado 48 h	17.2±20.1	1.0±0.7	42.2±17.0	17.3±7.7
Semi-desnatado 48h	18.1±19.8	0.9±0.7	38.6±15.3	16.7±8.1
Integral 48h	17.4±18.38	0.9±0.6	37.3±1.2	17.9±8.7

(Householder, et al 1981), analisaram leite desnatado, leite desnatado em gel e leite em creme gel, como diluentes de sêmen refrigerado a 5^0C, e sugeriram a utilização do leite desnatado devido à facilidade de preparação e devido ao fato de que os espermatozoides são melhor visualizados ao microscópio em leite desnatado, apesar de não ter tido diferença significativa entre as taxas de prenhez. No presente estudo também houve dificuldade de analisar os espermatozoides diluídos em leite UHT integral, quando foram realizados os testes de motilidade e vigor. Os resultados obtidos na motilidade espermática dentre o período de 24h são diferentes dos resultados de (Meirelles, et al 1998) os quais analisaram sêmen diluído em leite desnatado UHT de marcas diferentes refrigerado à 4^0C numa diluição com proporção 2:1. O leite da marca A apresentava 0.5% de gordura e o da marca B 0.1% de gordura. O leite da marca A provocou queda significativa de motilidade às 24 horas quando comparado ao leite da marca B. Os autores sugeriram que este fato poderia estar relacionado à maior quantidade de gordura apresentada pelo diluente da marca A, o que provocaria uma maior aglutinação dos espermatozoides, isto não foi observado neste estudo, provavelmente devido ao fato de que a motilidade é uma analise subjetiva. Não houve diferença em nenhuma das outras variáveis analisadas. Através desses resultados pode-se afirmar que na falta de leite UHT desnatado, o leite UHT semidesnatado e integral podem ser usados, uma vez que não causam prejuízos ao sêmen eqüino armazenado por até 48 horas.

REFERENCIAS

Ebertus, R. The dilution of stallion semen with whole cow milk.An Breed. v. 31, p. 313, 1963.

Hoffmann, L. Neues Instrumentarium zur künstlichen Befruchtunggroßer Haustiere (New instruments for artificial fertilisation in large domestic animals).Österr Monatsschr Tierheilk 1905;30:1-9.

Householder, D.D., Pickett, B.W., Voss, J.L., *et al*. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. J EquineVetSci , n.1, p. 9-13, 1981.

Meirelles, L.S.; Neves, A.P.; Vieira, M.J.; Keller, A.; Hott, A.K.; Moraes, I.M.A.; Garbade, P.; Gregory, R.M.; Mattos, R.C. uso de leite em pó desnatado não inativado e do leite desnatado UHT na preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. Ciencia Rural, Santa Maria, v.28, n.3, p. 467- 470, 1998.

Pickett, B.W.; Amann, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. J. Equine Vet. Sci., v. 7, n. 5, p.289-302, 1987.

Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L., Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5^{O} C. Theriogenologyv.23, p. 409-415, 1984.

Sieme, H.; Klug, E.; Schoon, H.A. Critical evaluation of practical methods to term ovulation and AI in relation to endometrial reaction in the mare Pferdeheilkunde v. 13, n. 5, p. 499, 1997.

Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Love, C.L; Garcia, M.C; Kenney, R.M. Effects of cooling rate and a storage temperature on the equine spermatozoal motility parameters. Theriogenology, v.29, n.5, p. 1043-1054, 1988.

COMPARAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE TRÊS DILUENTES PARA CONSERVAÇÃO DE SEMEN EQUINO RESFRIADO

Comparación de tres diluyentes para la refrigeración de semen equino

Comparison of the use of three diluents for preservation of equine cooled semen

Castro FS[1]; Mattos RC[2] ; Fiala Rechsteiner S[3*]

*[1] Mestranda PPGMAE – UFRGS, [2]Coordenador do Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos UFRGS - REPROLAB[3] Professora adjunta –HISTOREP- Departamento de Morfologia - IB/UFPel; * Rua Duque de Caxias, 250 Pelotas – RS – Brazil, Telefone +5553 81369282, e-mail:* sandrafiala@yahoo.com.br

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de tres diluyentes seminales en equinos. Se utilizaron 33 eyaculados de 3 sementales de fertilidad conocida. Luego de la recolección, el semen se dividió en tres alícuotas y diluyo en leche UHT desnatada (LD), BotuSemen ® (BS) o Special BotuSemen ® (BSS). Las muestras se analizaron inmediatamente después de la dilución (0h), 24h y 48h. Se verifico motilidad, viabilidad, integridad de la membrana y la funcionalidad de la membrana. Las muestras de semen que refrigeradas con el BSS mostraron una mejor calidad en el HOST y CFDA / PI (P <0,001) en los 24 (34,7 y 53,3%, respectivamente) y 48 h (46,1 y 56,1%, respectivamente) en comparación con los otros diluyentes. También el resultado dentro de 48 horas fue similar a la obtenida a las 24hs con los mismos parámetros, lo que indica que este diluyente promueve un aumento de la longevidad de los espermatozoides en comparación con otros analizados.

RESUME

This study aimed to compare the efficacy of three diluents used as equine extenders. Thirty-three ejaculates from 3 stallions of known fertility were used. After collecting the semen was divided into three aliquots and diluted in UHT skimmed milk (LD), BotuSemen ® (BS) or Special BotuSemen ® (BSS). Samples were analyzed immediately after dilution (0h), 24h and 48h. In these analyzes motility, viability, membrane integrity and membrane functionality were verified. Samples of semen which were cooled using the BSS showed better quality in HOST and CFDA / PI (P <0.001) in the 24 (34.7 and 53.3%, respectively) and 48 h (46.1 and 56.1% respectively) compared to the other extenders. Also the result within 48 hours was similar to that obtained in the 24 to the same parameters, which indicates that this extender promotes an increase in longevity of sperm, when compared to others.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a inseminação artificial é uma técnica amplamente utilizada em reprodução eqüina e permitida por diversas associações de raça no Brasil (Mattos, 1995), uma vez que, na espécie eqüina, os índices de fertilidade obtidos com a inseminação podem ser similares ou superiores aos obtidos com a monta natural (Palmer, 1984). O sêmen resfriado, mantido a +4ºC por 24h, apresenta índices de fertilidade semelhantes aos do sêmen fresco (Mattos, 1995; Keller *et al*., 2001). Não é possível preservar o sêmen por muito tempo sem o uso de um diluente. Embora o resfriamento do sêmen eqüino permita aumentar a longevidade da motilidade espermática, através da redução da atividade metabólica, o emprego de apenas este processo é ineficaz. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficácia de três diluentes utilizados com sêmen eqüino resfriado a 5º C. Foram utilizados no experimento 3 garanhões de fertilidade conhecida com idade entre 3 e 11 anos, pertencentes a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada na cidade de Porto Alegre, Brasil. A alimentação foi composta por pastagem natural e suplementação com concentrado a base de aveia. As coletas (11 de cada garanhão) foram realizadas com vagina artificial modelo Hannover. O exame imediato foi realizado no sêmen fresco. Após o ejaculado foi dividido em três alíquotas e diluido em leite desnatado UHT (LD), BotuSemen® (BS) ou BotuSemen Special® (BSS). As amostras foram analisadas logo após a diluição (0h), 24h e 48h. Nestas analises foi verificada motilidade, vigor, integridade de membrana através do teste hiposmótico (HOST) e funcionalidade de membrana em microscopia de fluorescência com espermatozóides corados em CFDA/PI. A analise de variância foi realizado comparando as médias obtidas nas analises realizadas, utilizando o teste de diferença mínima significativa (DMS), através do programa Statistix 9.0.

RESULTADOS

Os resultados estão resumidos na Tabela 1. Pode-se observar que as amostras de sêmen em que se utilizou o BSS apresentaram no HOST e CFDA/PI nas 24 e 48 horas comparado aos demais diluentes. No geral este diluente parece apresentar melhor resultado.

Tabela 1. Valores médios e erro padrão observados nos diferentes tratamentos

Tratamento	Motilidade	Vigor	HOST	CFDA/PI
LD 0 h	68,3[a]	2,9[a]	54,7[a]	74,1[a]
BS 0 h	67,6[a]	2,76[a],b	46,1b	70,1 [a],b
BSS 0 h	67,8[a]	2,76 [a],b	56,5[a]	75,8[a]
LD 24 h	45,8b,c	2,1 c,d	37,2c	59,9 c,d
BS 24 h	47,3b,c	2,2 c,d	33,3 c	52,7 d
BSS 24 h	55,1b	2,4 c	46,1b	65,1c
LD 48h	11,6e	0,9f	20,2d	33,0e
BS 48h	23,6d	1,5e	20,1d	28,5e
BSS 48 h	38,6c	1,8d,e	34,7 c	53,3d

Médias com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,01)

DISCUSSÃO

A escolha do diluente deve ser baseada, entre outras coisas, nas características individuais do animal, pois nenhum diluente é ideal para todos os garanhões (PROVINCE *et*

al., 1984). Pensando naqueles garanhões cujo sêmen não suporta o resfriamento, visando aumentar a longevidade dos espermatozóides, o Botusemen Special foi desenvolvido. No presente trabalho o diluente apresentou melhor resposta as 24 e 48 h, tanto no HOST como no CFDA/PI, além disso o resultado obtido nas 48 horas foi semelhante ao obtido nas 24 nos mesmos parâmetros avaliados, o que indica que este diluente promove um incremento na longevidade dos espermatozóides, quando comparado aos demais.

CONCLUSÃO

A adição do Botusemen Special ao sêmen eqüino parece aumentar a longevidade do mesmo, e apresenta melhores resultados comparado aos demais diluentes estudados.

REFERENCIAS

Keller, A., Malschitzky, E., Hött, A., Vieira, M.J., Gregory, R.M., Mattos, R.C. 2001. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. Anim. Repr. Sci. Proceedings. 3rd Int. Symp. Stallion Reprod .Colorado-E.U.A. p. 318-319.

Mattos, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária, UFRGS.1995.

Palmer, E. 1984 L'insemination artificielle des juments: bilan de 5 années de recherché et utilization pratique. In: Le cheval, Reproduction Selection, Alimentation Explotation, INRA (ed), p. 133,.

Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L., 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5O C. Theriogenology v.23, p. 409-415, .

Andrología # 22

EFECTO DEL BUTAPHOSPHAN Y VITAMINA B12 INYECTABLES SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO EN SEMENTALES

Effect of intramuscular injection of butaphosphan and vitamin b12 on the quality of fresh and cooled stallion semen

Cazales N*[a]; Santos GA[a]; Farias M[a]; Bastos HBA[a]; Winter GHZ[a]; Bustamante-Filho IC[a], Rodrigo Mattos RC[a].

*[a]REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. *Bolsista CAPES/ UDELAR*

RESUME

Butaphosphan is a phosphoric acid compound that is available in many countries in combination with vitamin B12. Studies in cattle, horses, swine, broilers, and mice have shown these products to improve general health status by stimulating feed intake, immune system, and digestive function. There is also evidence that butaphosphan and cyanocobalamine are able to reduce stress responses in pigs, sheep, cattle and mice. The purpose of this study was to evaluate the action of butaphosphan, in combination with vitamin B12 on the quality of fresh and cooled stallion semen. Four healthy stallions kept in the same place and under the same management were randomly assigned to two treatment groups. First stallions of group A were treated with intramuscular injection of butaphosphan (5ml/100Kgbw) (Catosal B12®, Bayer S.A., São Paulo, Brazil) twice a week for 84 days, while the group B did not receive any treatment. After that both groups were not treated for another 84 days allowing a washout period for the treated group. Then, the groups were reversed, group B was treated with butaphosphan and group A acted as a control for another 84 days. Finally a last 84 days washout period was evaluated, where both groups were kept without any treatment to complete the 336 days of the study. In order to reduce extragonadal sperm reserves and ensure uniformity of ejaculates, semen from each stallion was collected using an artificial vagina daily for five days, prior to the semen collection used for analysis. Semen was collected twice a week over a time of 336 days starting on April 5, 2011. Semen was diluted to 25 million sperm/mL in skim milk and evaluated for total sperm count, total and progressive sperm motility (light microscopy), membrane integrity (CFDA/PI staining) and membrane functionality (HOS test) at 0 and 24 hours after preservation at 5º C. Data were analyzed by one way ANOVA and means compared by the Tukey test at 5% level of significance. Experimental endpoints were analyzed to compare the values for the treated stallions in the period of time between the sixty and eighty four days of treatment versus the same stallions without treatment. No significant differences in motility, membrane integrity, membrane functionality and morphology were detected. Results show that the use of butaphosphan, in combination with vitamin B12 in the given doses does not alter semen quality of stallions.

INTRODUCCION

En general, el origen de la sub-fertilidad en los machos es multifactorial. La caída en la calidad seminal probablemente sea el resultado de interacción entre factores genéticos y ambientales que pueden ser fácilmente manipulados (1, 2, 3). Trabajos realizados en diversas especies sugieren que la nutrición afecta la espermatogenesis y pese a ser un factor importante que repercute directa e indirectamente en la producción y calidad espermática, es generalmente ignorada y no tomada en cuenta para el diagnostico y tratamiento de determinadas afecciones reproductivas. Existe poca información sobre la influencia de determinados nutrientes en la espermatogenesis por lo que en los últimos años ha aumentado el interés en el rol de las vitaminas B y ciertos minerales como moduladores de la fertilidad tanto en el hombre como en los animales (3, 4, 5). El butafosfan y la vitamina B12 modulan varias funciones celulares, como la oxidación de los ácidos grasos, acetil-CoA y la utilización del piruvato y lactato como sustrato de energía. Tanto la vitamina B12 como el fosforo aumentan la actividad de varias enzimas antioxidantes importantes para el metabolismo celular, intervienen en la replicación celular y del ADN y son muy importantes para el mantenimiento de la estabilidad genómica y la homeostasia celular (5, 6, 7, 8, 9). Estos procesos son esenciales en la espermatogenesis; por esto, es que desajustes en esta vía metabólica probablemente perjudiquen la reproducción (3, 9). Nuestro trabajo objetiva estudiar el efecto de la asociación vitamina B y butafosfan sobre los parámetros seminales del padrillo. Para esto se evaluara la acción del butafosfan en combinación con la vitamina B12 (Catosal B12®, Bayer S.A., São Pablo, Brasil) sobre la calidad del semen fresco y refrigerado de padrillos.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES. Fueron utilizados cuatro padrillos saludables, siendo tres de la raza Pura Sangre de Corrida (PSC) y un Shetland Pony, sexualmente maduros con fertilidad conocida y con buena condición corporal (entre 5 y 13 años de edad) pertenecientes al Laboratorio REPROLAB. Los animales se encontraban todos en el mismo local y bajo un mismo régimen de manejo. Quedaban sueltos en piquetes individuales de 12 por 12 metros con agua y sal mineral a voluntad, racionados con 2,5 kg de avena en grano y heno de alfalfa dos veces por día durante todo el experimento. *TRATAMIENTO.* Una vez terminada la primera etapa de limpieza y uniformidad de los eyaculados, los padrillos entraron en un régimen de colecta y tratamiento con Catosal B12® de dos veces por semana (martes y viernes) durante los 336 días de experimento. Los padrillos fueron utilizados en un esquema experimental de 2 x 2 crossover, siendo designados al azar en dos grupos (A y B) de 2 padrillos cada uno (2 n). Uno de los grupos sirvió como control y el otro como grupo tratado.

GRUPOS	PPE (5dias)	ET 1 (84dias)	ET 2 (84dias)	ET 3 (84dias)	ET 4 (84dias)
A (2n)	CD (5 días)	GT	Washout	GC	GC
B (2n)	CD (5 días)	GC	GC	GT	Washout

Figura 1: Esquema gráfico de las 5 etapas del tratamiento: 2n – dos padrillos por grupo; PPE – Período de padronisacion espermática; ET 1 – Etapa 1 (tratamiento grupo A); ET 2 – Etapa dos (Período washout grupo A); ET 3 – Etapa 3 (tratamiento grupo B); ET 4 – Etapa 4 (Período washout grupo B); CD – Coletas de semen diarias; GT – Grupo tratado; GC – Grupo controle.

RESULTADOS

SEMEN FRESCO (0h):

Tabla 1: Valores de medias, desvío padrón y *P* del semen fresco durante los 24 días finales del tratamiento (TR) y control (CN).

	TR	CN	P
Volúmen (mL)	37,25 ± 14,31	39,2 ± 18,4	0,62
Concentración (x106/mL)	156,5 ± 72,7	160,6 ± 80,8	0,82
Numero Total de espermatozoides (x106)	5250 ± 2,4	6010 ± 3,4	0,29
Motilidad Total %	75 ± 15	71 ± 12	0,22
Motilidad Progresiva %	54 ± 17	51 ± 16	0,43
Vigor (1 – 4)	3,8 ± 0,7	3,8 ± 0,7	0,99
Membrana Plasmática Funcional (HOST) %	68,6 ± 13,3	67,4 ± 12,7	0,71
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI) %	71,2 ± 13,6	70,7 ± 10,7	0,84
Tincion supravital (eosina/nigrosina) %	73,4 ± 14.2	71,8 ± 11,4	0,60
Morfologia Espermática Normal %	58 ± 15	54 ± 12	0,22

SEMEN REFRIGERADO 24h:

Tabla 2: Valores de medias, desvío padrón y *P* del semen preservado por 24 horas a + 5°C durante los 24 días finales del períodos de tratamiento (TR) y control (CN).

	TR	NC	P
Motilidade Total %	54 ± 21	49 ± 18	0,27
Motilidade Progressiva %	38 ± 18	32 ± 16	0,14
Membrana Plasmática Funcional (HOST) %	49 ± 16	50 ± 15	0,62
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI) %	60 ± 16	58 ± 15	0,63
Tincion Supravital (eosina/nigrosina) %	64 ± 16	61 ± 15	0,56

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demostraron que el tratamiento intramuscular con Catosal B12® a una dosis de 5 ml/100 KgPV dos veces por semana por 84 días no mejoro ninguno de los parámetros seminales evaluados por nuestro equipo de trabajo. Esto se contrapone a los resultados obtenidos en otras especies donde la utilización de vitamina B mejoro los parámetros seminales del hombre y el toro (3). Esto probablemente se deba a que los padrillos utilizados en nuestro experimento fueron padrillos fértiles con buena calidad seminal y que en nuestro estudio se utilizo como tratamiento solo la combinación de vitamina B12 con butafosfan a diferencia de los nutriceuticos utilizados en otros experimentos donde además de la vitamina B12 se utilizó acido fólico, zinc entre otras vitaminas y minerales. Nosotros sugerimos seguir realizando estudios de esta naturaleza para poder identificar cuales nutrientes causan mayor impacto en la fertilidad de los equinos. Probablemente para futuros estudios se tenga que aumentar la dosis de la vitamina B12, utilizar un mayor número de padrillos con problemas de fertilidad y seguramente combinar la vitamina B12 y el fosforo con otros nutrientes como el acido fólico, zinc, L-carnitina y ome-

ga-3 (DHA) que ya han sido probados tanto en bovinos como en humanos. En conclusión, nuestro trabajo demostró claramente que el tratamiento intramuscular con butafosfan y vitamina B12 a las dosis dadas no mejoro la calidad del semen fresco ni refrigerado de los padrillos. De todas maneras creemos que hay que seguir investigando en esta área para poder detectar cuales son los nutrientes y las dosis que tienen mayor impacto en la fertilidad de los padrillos y poder tener acceso a diferentes productos que nos ayuden a aumentar la eficiencia en la producción equina.

REFERENCIAS

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995; 332:281–5.

Kuroki Y, Iwamoto T, Lee JW, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, et al. Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. J Hum Genet 1999; 44:289–92.

Wai Yee Wong, M.D, Ph.D.,a,b Hans M. W. M. Merkus, M.D., Ph.D.,a Chris M. G. Thomas, Ph.D.,a,c Roelof Menkveld, Ph.D.,d Gerhard A. Zielhuis, Ph.D.,b and Re´ gine P. M. Steegers-Theunissen, M.D., Ph.D. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double--blind, randomized, placebo-controlled trial. fertility and sterility_vol. 77, n° 3 march 2002.

Ciereszko A, Dabrowski K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. Biol Reprod 1995; 52:9828.

Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers- Theunissen RP.

Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. Hum Reprod 2006; 21:1725–33.

Masoud Y. Al-Maskari M.D., Ph.D. a, MostafI, Waly M.P.H., Ph.D. b, Amanat Ali Ph.D. b, Yusra S. Al-Shuaibi M.Sc. b, Allal Ouhtit M.P.H., Ph.D. Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. Nutrition 28 (2012) e23–e26.

Pereira R.A.; Farias L.B.; Theobald F.; Braunder C.C.; Lima M.E.; Corrêa M.N. Metafilaxia com Catosal B12® para incrementar o ganho de peso de bezerros durante o início da recria. A Hora Veterinária. Ano 32; N° 188; 2012; p 23-26.

Lopes G.F.; Lehugeur C.M.; Dreyer C.T.; Ribeiro L.A.O. Efeito da aplicação de Catosal B12® no início do encarneiramento sobre a eficiência reproductiva de ovelhas mantidas a campo no Rio Grande do Sul/Brasil. A Hora Veterinaría, Ano 30, N° 178, 2010, p 13-17.

MICHAEL F. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutation Research 475 (2001) 57–67.

Andrología # 23

EFECTO DE DIFERENTES METODOS DE CONCENTRACION SOBRE LA CALIDAD Y TASA DE RECUPERACION ESPERMATICAS

Effect of different sperm concentration methods on sperm quality and recovery rate

Davolli GM; Camozzato GC; Figueiredo MM, Bastos HBA; Cazales N*; Mattos RC

*REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. *Bolsista CAPES/UDELAR*
gabriel.davolli@gmail.com (G.M. Davolli)

RESUME

The ability to increase sperm concentration is important to process sperm for cooling and freezing. The available techniques are also useful, especially with poor quality semen, for separating spermatozoa from seminal plasma and extender, concentrating sperm for freezing and cooling, and for low-dose insemination. At the moment, this concentration is usually done by centrifugation. However, centrifugation subjects the sperm to a certain amount of stress, specially in some stallions . Filtration of semen was also proposed as a concentrating method, and it was thought that it would result in less sperm injury. The objective of this study was to compare centrifugation, cushioned centrifugation and semen filtration for their sperm retention efficiency and their effects on sperm quality parameters. Fifteen ejaculates from four stallions were collected and immediately extended with skim milk 1:1 (v/v). Extended semen was adjusted to a final concentration up to 50 x 10^6 sptz/mL. Three aliquots of each ejaculate were submitted to the following procedures: (a - Cent) centrifugation of 20 mL of extended semen in a 50 mL conical tube at 600xg for 10 min, (b - Cushion) centrifugation of 20 mL of extended semen in a 50 mL conical tube with 1 mL of cushion solution (Eqcellsire® component B, IMV, France) at the bottom, and (c - Filter) filtration with commercial filter (Sperm Filter®, Botupharma, Brazil). The sperm was ressuspended and immediately evaluated for total motility, progressive motility, velocity, membrane funcionality (HOST) and membrane integrity (CFDA/PI). The sperm recovery rate of each method was calculated dividing the total number of sperm recovered by the initial total sperm number of each aliquot. The results in table 1 show no significant difference comparing the different methods for total motility, progressive motility, sperm velocity, membrane functionality and membrane integrity. Regarding the sperm recovery rates, there was a significant difference between conventional centrifugation and centrifugation using cushion solution at the bottom of the tube. Based on our results, we conclude that centrifugation with cushion is more advantageous than conventional centrifugation, although it did not show a better recovery rate compared to filtration.

INTRODUCCION

Muchos padrillos genéticamente valiosos son considerados “poor coolers”, debido a que su fertilidad se ve comprometida cuando el semen es almacenado a + 4°C, convirtiéndolos en no aptos para la reproducción con semen refrigerado (1). Una de las principales

causas de esto es la toxicidad del plasma seminal, demostrándose que la retirada de este, por centrifugación mejora la calidad espermática (3,4,5). La inseminación con bajo número de espermatozoides ("*low dose insemination*") se ha venido utilizando cada vez más y el interés por mejorar la eficacia de esta técnica radica en poder satisfacer la creciente demanda de nuevas tecnologías como la inseminación con semen sexado. Beneficios adicionales de esta técnica es poder utilizar de manera más eficiente al padrillo, mejorar la eficiencia del semen congelado y probablemente poder aumentar la fertilidad de los padrillos sub-fértiles (8). Por lo tanto, la posibilidad de aumentar la concentración espermática es importante para el procesamiento de los espermatozoides destinados a la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Estas técnicas, disponibles hoy en día, también son útiles para remover el plasma seminal y los agentes crioprotectores especialmente en padrillos sub-fértiles con semen de baja calidad y para aplicación de técnicas de inseminación con baja dosis (7). Por el momento, la técnica de concentración más utilizada mundialmente es la centrifugación. Desafortunadamente la centrifugación somete a los espermatozoides a cierto grado de estrés perjudicando más a algunos padrillos que a otros (9). Como alternativa a la centrifugación convencional se han propuesto técnicas de filtración y de gradientes de densidad para disminuir el daño a los espermatozoides. El objetivo de nuestro estudio fue comparar tres métodos de concentración espermática: 1) la centrifugación convencional, 2) la centrifugación con diferentes gradientes de densidad, y 3) la filtración, para determinar cuál de estos métodos es más eficiente y cuáles son sus efectos sobre los parámetros de calidad espermática.

MATERIALES Y METODOS

Fueron utilizados 15 eyaculados de cuatro padrillos pertenecientes al Laboratorio de Reproducción Animal REPROLAB de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil. El semen colectado con vagina artificial Hanover fue filtrado y la fracción rica en espermatozoides fue extendida inmediatamente con leche descremada UHT a una concentración final de 50 x 10^6 spz/ml. Tres alícuotas de 20 ml de cada eyaculado fueron sometidas a los siguientes tratamientos: (a-Cent) centrifugación convencional de 20 ml de semen diluido en tubos cónicos de 50 ml a 600xg por 10 minutos, (b-Cushion) centrifugación de 20 ml de semen diluido en tubos cónicos de 50 ml con 1 ml de solución cushion (Eqcellsire® componente B, IMV, France) en el fondo del tubo, y (c- Filtro) el semen diluido fue filtrado con un filtro comercial (Sperm Filter®, Botupharma, Brazil) diseñado para retener los espermatozoides y dejar pasar el plasma seminal. Los espermatozoides concentrados fueron resuspendidos e inmediatamente evaluados en concentración, número total, motilidad total y progresiva, velocidad, funcionalidad de membrana (HOST) e integridad de membrana (CFDA/PI). El porcentaje de recuperación de cada método fue calculado dividiendo el número total de espermatozoides recuperados por el número total de espermatozoides inicial de cada alícuota pre tratamiento.

RESULTADOS

Tabla 1. Efecto de los diferentes métodos de concentración espermática sobre la calidad y las tasas de recuperación espermática. Means (± SD.)

	Cent	Cushion	Filter	P (value)
Motilidad Total (%)	56 ± 26	59 ± 27	54 ± 26	0.59
Motilidad progresiva (%)	27 ± 14	28 ± 14	38 ± 23	0.18
Velocidad (1-5)	2.3 ± 0.9	2.2 ± 0.9	2.4 ± 0.6	0.54
HOST (%)	62 ± 7	64 ± 8	68 ± 8	0.15
CFDA/PI (%)	67 ± 14	72 ± 17	65 ± 14	0.52
Recuperacion espermatica (%)	72a ± 11	85b ± 18	77ab ± 14	0.05

(a,b): Diferentes letras difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

DISCUSION

Los resultados mostrados en la tabla 1 no mostraron diferencias significativas entre los diferentes métodos de concentración para los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad, funcionalidad de membrana e integridad de membrana. En lo que respecta a la tasa de recuperación espermática se vio una diferencia significativa entre la centrifugación convencional y la centrifugación con cushion en el fondo del tubo. Basados en nuestros resultados podemos concluir que la centrifugación con cushion es una mejor opción que la centrifugación convencional y que el filtro es una buena alternativa ya que no mostro diferencias significativas en cuanto a las tasas de recuperación espermática.

REFERENCIAS

Barrier-Battut L., Bonnet C., Giraudo A., Dubois C., Caillaud M., Vidament M. Removal of seminal plasma by centrifugation, before cooled storage, enhances membrane stability of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science 121S, 2010, p S188-S190.

Batellier F., Vidament M., Fauquant J., Duchamp G., Aranaud G., Yvon J.M., Magistrini M. Advances in cooled semen technology. Anim. Reprod. Sci. 68, 181-190.

Jasko D.J., Moran D.M., Farlin M.E., Squires E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. Theriogenology 35, 1991, p 1059-1067.

Pagl R, Aurich J.E., Müller-Schlösser F., Kankofer M., Aurich C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. Theriogenology 66, 1115-1122, 2006.

Webb G.W., Dean M.M., Humes R.A., Heywood J.S. Comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold stored stallion semen. J. Equine Vet. Sci. 29, 229-232, 2009.

Brinsko S.P., Crockett E.C., Squires E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology 54, 129-136, 2000.

Correa J.R., Zavos P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. Theriogenology 46, 1225-1232, 1996.

Morris L.H.A., Allen W.R. An overview of low dose insemination in the mare. Reprod. Domest. Anim. 37, 206-210, 2002.

Alvarenga M.A.; Melo C.M.; Magalhães L.C.O.; Papa F.O. A new method to concentrate equine sperm. Animal Reproduction Science. 121S; S186-S187; 2010.

COLHEITA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EM EQUINOS (Equus caballus)

Collection and cryopreservation of equine (Equus caballus) cauda epididymis spermatozoa

Guedes Campos D[1]; Vianna Martins A[2]; Monteiro GA[3]; Emerim Pinna A[4]; de Moura Carvalho CF[5].

[1] Graduando em Medicina Veterinária do Centro universitário Serra dos Órgãos,UNIFESO- Teresópolis-Rj,[2] Cordenador e Professor do Curso de Medicina Veterinária do Medicina Veterinária do Centro universitário Serra dos Órgãos,UNIFESO-Teresópolis -Rj, [3] Pós Graduando em Medicina Veterinária- UNESP-Botucatu,[4] Professora Adjunta em Medicina Veterinaria Universidade Federal Fluminense-Niterói-Rj, [5]Professora do departamento de Reprodução Animal em Medicina Veterinária do Centro universitário Serra dos Órgãos,UNIFESO-Teresópolis Rj.
diegoguedescampos@hotmail.com

RESUME

The ability to freeze semen for later use enabled the worldwide distribution of the genetic material of high value livestock breeding of many animal species, including enabling the storage of semen of animals that come to death. This study deals with the collection and cryopreservation of semen from the cauda epididymus of horses. It is a topic of great relevance, because many high-value livestock stallions sometimes may die or suffer some serious injury that prevents mating or even semen collection by traditional methods. This technique allows, even after death, the possibility to preserve the genetic material of animals, collecting sperm from the epididymal tail.

INTRODUÇÃO

A colheita e criopreservação de sêmen da cauda do epidídimo de eqüinos é um tema de grande relevância, pelo fato de que muitos garanhões de alto valor zootécnico, às vezes, vão a óbito, ou sofrem algum ferimento grave que venha impossibilitar a cobrição ou mesmo a colheita de sêmen por métodos tradicionais, sem que tenham o seu material genético preservado. Esta técnica veio possibilitar que mesmo após o óbito ainda seja possível preservar o material genético destes animais, coletando espermatozóides da cauda do epidídimo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a importância o os detalhes da técnica do fluxo retrogrado para a recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo em eqüinos. A hipótese foi a técnica utilizada é eficaz e a recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo é uma opção de manter a valiosa genética de eqüinos em fase terminal.

METODOLOGIA

Para realização deste trabalho utilizou-se quatro equinos da raça Campolina, com idade variando entre 3,5 e 4 anos, que pertenciam à propriedade do Haras Modelo, município de Guapimirim – RJ, os quais foram orquiectomizados no dia 31 de maio de 2012. A técnica escolhida para recuperar essas células espermáticas foi a do fluxo retrógrado. Em seguida, cada epidídimo foi separado em três porções, para facilitar a lavagem. Foi injetado 40 ml diluente (Botu-sêmen®) a 37ºC no lúmen de cada epidídimo, fazendo a lavagem. Todas as amostras foram submetidas aos cálculos de concentração espermática, a avaliação da concentração espermática. O conteúdo foi distribuído em tubos de centrífuga de 10 ml e centrifugado a 600g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso com diluente Botu-crio®. Imediatamente após a ressuspeção, foi feita nova análise. As amostras de sêmen dos quatro cavalos, que foram ressuspendidas em diluente Botu-crio®, na concetração de 100 x 10^{-6} espermatozoides, assim as amostras foram acondicionadas em recipientes apropriados Botuiáe levadas para refrigeração a 5ºC por 26 horas. Posteriormente, foi realizada nova análise.

RESULTADOS

Quando foi feita a coleta com Botu-sêmen®, o sêmen do cavalo 1 apresentava 5% de motilidade, vigor 1 e volume do coletado 80 ml. O cavalo 2 apresentava 15% de motilidade, vigor 1 e volume do coletado 80 ml. Imediatamente após a ressuspeção, foi feita nova análise em que ambas as amostras apresentavam 90% de motilidade total, o cavalo 1 apresentava vigor 3 para 4, e o cavalo 2, vigor 4 para 5. Na concentração/ml, o cavalo 1 apresentou 116 x 10^{-6} e a concentração total de espermatozoides foi de 9.280 x 10^{-6}/ml, sendo a concentração de viáveis de 8.352 x 10^{-6}. O cálculo foi feito considerando a motilidade real depois de feita a diluição com o botu-crio®. O cavalo 2 apresentou concentração total de espermatozoides 9.600 x 10^{-6}, com concentração de viáveis 8.352 x 10^{-6}. O cavalo 3 apresentou volume total após coleta de 80ml, motilidade de 5% e vigor 1. A concentração total de espermatozoides foi de 159 x 10^{-6} ml. A motilidade após a ressuspensão com diluente de congelação foi de 90%, vigor de 3 a 4, e viáveis 11.448 x 10^{-6} bilhões de espermatozoides. O cavalo 4 também apresentou volume total após coleta de 80ml, motilidade de 5% e vigor 1. A concentração total de espermatozoides foi de 162 x 10^{-6} ml. A motilidade após a ressuspensão com diluente de congelação foi de 90%, vigor de 3 a 4, e viáveis 11.644 x 10^{-6} bilhões de espermatozoides. As amostras de sêmen dos quatro cavalos, que foram ressuspendidas em diluente Botu-crio®, na concetração de 100 x 10^{-6} espermatozoides, assim as amostras foram acondicionadas em recipientes apropriados Botuiá e levadas para refrigeração a 5ºC por 26 horas. Posteriormente, foi realizada nova análise e todos apresentavam em média 70% de motilidade e vigor 3.As Tabelas 01 e 02, a seguir, mostram os resultados em quadro comparativo.

Tabela 1: Resultados da colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo.

Cavalos	Volume	Motilidade após coleta	Vigor após coleta	Concentração total (x 10-6/ ml)	Motilidade após a ressuspensão	Vigor final	Viáveis (x 10-6)
1	80 ml	5%	1	9.280	90%	3 a 4	8.352
2	80 ml	15%	1	9.600	90%	4 a 5	8.352
3	80 ml	5%	1	12.720	90%	3 a 4	11.448
4	80 ml	5%	1	12.960	90%	3 a 4	11.644

Tabela 2: Resultados da motilidade e vigor após a refrigeração a 5º C por 26 horas.

Cavalos	Volume	Motilidade após as 26 horas de refrigeração a 5º C.	Vigor após 26 horas de resfriamento a 5º C.
1	80ml	70%	3
2	80ml	70%	3
3	80ml	70%	3
4	80ml	70%	3

DISCUSSÃO

A técnica utilizada no experimento deste estudo foi a de fluxo retrógrado, como foi descrita por Granemann (2006), Lunelli*et al*. (2010) e Monteiro (2009). E, seguindo recomendação feita por Dell'Aqua Jr (2001), a colheita dos espermatozoides foi feita com Botu-sêmen®. Após a colheita, foi verificada uma motilidade dos espermatozoides dos quatro animais do estudo entre 5 e 15% e vigor classificado como 1. Este resultado está de acordo com o estudo de Guasti *et al*. (2010), que afirmam que a maior parte dos espermatozoides encontra-se imóvel após o processo de lavagem. Em seguida, após o processamento do sêmen coletado, o conteúdo foi distribuído em tubos de centrífuga, por 10 minutos a 600g, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso com diluente Botu-crio® na concetração de 100×10^{-6} de espermatozoides. Assim, nova análise foi feita, e constatou-se que as amostras apresentavam 90% de motilidade total e vigor entre 3 para 5. Esta observação corrobora o que diz Melo *et al*. (2007-a), que em seu estudo revelaram que o uso do diluente Botu-crio® permite um incremento significativo nas taxas de fertilidade do sêmen de epidídimo de garanhões. As amostras de sêmen dos quatro cavalos, que foram ressuspendidas em diluente Botu-crio®, foram acondicionadas em Botuiá e levadas para refrigeração a 5ºC por 26 horas. Posteriormente, foi realizada nova análise e todos apresentavam em média 70% de motilidade e vigor 3. Assim, este estudo concorda com Melo *et al*. (2007-b), que afirmam haver um maior sucesso no incremento dos índices de fertilidade do sêmen de epidídimo, provavelmente relacionado à composição do meio diluidor Botu-Crio®, que tem a capacidade de promover a melhoria na congelabilidade e fertilidade de sêmen congelado de garanhões. Os autores Melo *et al*. (2008) também concluíram, em seu estudo, que o Botu-Crio® foi capaz de manter a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides congelados do epidídimo de garanhões.

CONCLUSÕES

- A técnica de fluxo retrógrado é eficaz para colheita de espermatozoides do epidídimo.
- O uso do diluente Botu-crio® permite um incremento nas taxas de motilidade e vigor do sêmen de epidídimo coletado de garanhões, observado após o processamento da colheita e resfriamento, em comparação com o apresentado imediatamente após a colheita.
- O incremento desta biotecnologia e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo não dependem da adição do plasma seminal para que a viabilidade espermática seja atingida.
- O procedimento de colheita e resfriamento do sêmen do epidídimo de garanhões pós-orquiectomia é eficaz.
- O domínio da técnica adequada foi eficaz para a captação do maior número de células espermática possíveis.

REFERÊNCIAS

Dell'aqua Jr, J.A.; Papa, F.O.; Zahn, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. Animal Reproduction Science, v.68, p.344-346, 2001.

Guasti, P.N.; Monteiro, G.A.; Dell'aqua Jr, J.A.; Maziero, R.R.D.; Avanzi, B.R.; Zahn, F.S.; Melo, C.M.; Papa, F.O. Effects of pentoxifylline on cryopreserved equine epididymal sperm. Fifth International Conference on the Epididymis, Out, 25-28, Águas de São Pedro - SP, 2010.

Lunelli, D.; Camargos, C.E.; Michelotto Junior, P.V.; Silveira, B.; Leal, R.T.; Criopreservação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de garanhão da raça boulogne após óbito inesperado-relato de caso. Abraveq, v.29, p.308-309, 2010.

Melo, C.M.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A. Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Botucatu: FMVZ – UNESP, 2008.

Melo, C.M.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A.; Dell'aqua Jr., J.A.; Zahn, F.S.; Orlandi, C.; Martin, I. Semen storage for 24 h using different cooling. Journal of Equine Veterinary Science, v.27, p.171-175, 2007-a.

Melo, C.M.; Papa, F.O.; Fioratti, E.G.; Villaverde, A.I.S.B.; Avanzi, B.R.; Monteiro, G.; Dell'aqua Jr, J.A.; Pasquini, D.F.; Alvarenga, M.A. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. Animal Reproduction Science, v.5, n.108, p.30, 2008.

Monteiro, G.A. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

Monteiro, G.A.; Guasti, P.N.; Papa, F.O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. Veterinária e Zootecnia, v.16, n.3, p.448-458, 2009.

Monteiro, G.A.; Papa, F.O.; Zahn, F.S.; Dellaqua Jr, J.A.; Mello, C.M.; Maziero, R.R.D.; Avanzi, B.R.; Alvarenga, M.A.; Guasti, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. Animal Reproduction Science, v.127, p.197-201, 2011.

Morris, L.; Tiplady, C.; Allen, Wr. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. Theriogenology, v.58, p.643-646, 2002.

Muradás, P.R. Viabilidade e teste de criopreservação de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de equinos. Dissertação de Mestrado, Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

Muradás, P.R.; Weiss, P.R.; Kozick, L.E.; Granemann. L.C.; Santo, I.W.; Pimpão, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos em vagina artificial e em cauda do epidídimo. Archives of Veterinary Science, v.1, p.69-74, 2006.

Papa, F.O.; Melo, C.M.; Fioratti, E.G; Dell'aqua J.R.; Zahn, F.S.; Alvarenga, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. Animal Reproduction Science, v.107, p.293-301, 2008.

Andrología # 25

UTILIZAÇÃO DE COLESTEROL NA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES *BAD COOLER*

Utilizacion de colesterol en semen refrigerado de padrillos "bad coolers"

Use of cholesterol in bad cooler stallion semen refrigeration

Hartwig FP[1], Lisboa FP[1], Hartwig FP[2], Carmo MT[1], Alvarenga MA[1], Papa FO[1], Dell`Aqua Jr JA[1]

*[1]Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP 18610-970, Brasil; [2] Laboratório de Genômica Funcional (CDTec), UFPel, Pelotas-RS, Brasil, *Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP, 18610-970, Brasil; email: felipe_hartwig@hotmail.com; telefone: (55) 53 81155430*

RESUMEN

La inseminación artificial con semen refrigerado transportado es una técnica esencial para los programas actuales de la reproducción equina. Entre temperaturas de 19 y 8°C durante la refrigeración, la membrana espermática se somete a un estado de transición de los fosfolípidos, lo que predispone a las lesiones por rotura. La adición de colesterol reduce la temperatura de transición de fosfolípidos y mantiene un estado fluido a bajas temperaturas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de colesterol sobre la calidad espermática después de la refrigeración durante 24 horas a 5 y 15°C. Después de la refrigeración, los grupos tratados (con el colesterol) mostraron valores significativamente mejores de la motilidad total, motilidad progresiva y células rápidas que sus controles respectivos. Además, en los grupos tratados refrigerados a 5ºC mostraron valores significativamente mejorados para los mismos parámetros que en los grupos tratados a 15° C, y los grupos tratados mostraron integridad de la membrana superior que el grupo de control a 15°C. En conclusión, la adición de colesterol cargado-ciclodextrina mejora la calidad del semen refrigerado de sementales que no refrigeran bien ("bad coolers") por sistemas convencionales.

RESUME

Artificial insemination with transported cooled semen is an essential technique for current programs of equine reproduction. Between the temperatures of 19 and 8 °C during refrigeration, the spermatic membrane undergoes a transition state of phospholipids, thus predisposing to lesions by rupture. The addition of cholesterol reduces the phospholipid transition temperature and maintains a fluidic state at low temperatures. This study aim was to evaluate the effect of cholesterol addition in spermatic quality after refrigeration for 24h at 5 and 15 °C. After refrigeration, the treated groups (with cholesterol) showed significantly improved values of total motility, progressive motility and rapid cells than their respective controls. Furthermore, the treated groups cooled at 5 °C showed significantly improved values for the same parameters than the treated groups at 15 °C, and the treated groups showed superior membrane integrity than the control group at 15 °C. In conclusion, the addition of cholesterol loaded-cyclodextrin improves the cooled semen quality of bad cooler stallions.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial com sêmen refrigerado transportado é uma técnica essencial para os atuais programas reprodutivos de eqüinos. Com a refrigeração é possível reduzir o metabolismo celular e aumentar o tempo de viabilidade dos espermatozóides, possibilitando a realização de inseminações até 72 horas após a ejaculação (Pimentel & Carneiro). No entanto, entre as temperaturas de 19ºC e 8ºC durante a refrigeração, a membrana espermática sofre uma fase de transição dos fosfolipídios, alterando seu estado líquido para um estado de gel. Essa mudança de estado promove um enrijecimento da membrana predispondo a lesões por rupturas, além de alterações na organização proteico/lipídica original, acarretando em perda da função celular (Moran et al., 1992; Graham, 1996). A taxa de colesterol/fosfolipídio da membrana é o principal fator para manutenção da integridade da membrana durante o processo de refrigeração (Darin-Bennett & White, 1977). O colesterol reduz a temperatura de transição dos fosfolipídios e mantém um estado fluído a baixas temperaturas, desta forma reduzindo os danos a estrutura da membrana plasmática (Crocket, 1998). Além disso, existem diferenças na composição lipídica de membrana entre indivíduos da mesma espécie, gerando variações na resistência espermática ao processo de refrigeração. Alguns garanhões denominados "*bad cooler*" apresentam queda abrupta de fertilidade após o processamento, refrigeração e transporte do sêmen, fato que limita a utilização desses animais e gera significativas perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do colesterol sobre a qualidade espermática após a refrigeração por 24 horas a 5ºC e 15ºC.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois ejaculados de 12 garanhões "*bad cooler*" foram colhidos. Os ejaculados foram inicialmente divididos em dois grupos: controle, no qual o sêmen foi diluído a 30 x 10^6 de espermatozóides/ml com diluente a base de leite desnatado (Botu-Sêmen®) e fracionado em uma alíquota de 20 ml. No grupo tratado o sêmen foi diluído como no grupo controle mais a adição de 150 μL de 6.1 mM de colesterol ligado à ciclodextrina (CLC). Após, as amostras do grupo controle e do grupo tratado foram divididas em duas alíquotas de 10 ml, no qual cada alíquota de cada grupo foi refrigerada a 5ºC e a 15ºC por 24 horas. As amostras de sêmen foram avaliadas antes e depois da refrigeração por sistema de análise computadorizada de espermatozóides (CASA) para motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) foram realizadas através da associação das sondas fluorescentes carboxifluoresceína e iodeto de propídeo e avaliada por microscopia de epifluorescência. Todos os parâmetros foram analisados por ANOVA com medidas repetidas para dois fatores, seguido de testes t pareados com correção de Bonferrini. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a refrigeração os grupos tratados com colesterol apresentaram parâmetros de MT, MP e RAP significativamente maiores que os grupos controle, bem como o grupo tratado refrigerado a 5º C apresentou parâmetros de MT, MP e RAP superiores ao grupo tratado refrigerado a 15º C. Os grupos tratados com colesterol apresentaram IMP superior ao grupo controle refrigerado a 15ºC (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios (± desvio padrão) dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) antes da refrigeração (Inicial) e após o armazenamento por 5º C e 15º C por 24h nos grupos controle e tratado.

	Inicial	5º C		15º C	
		Controle	Tratado	Controle	Tratado
MT (%)	80±8	57±17c	76±12a	56±20c	69±15b
MP (%)	41±7	27±15c	41±14a	24±17c	33±16b
RAP (%)	70±8	44±22c	66±16a	42±23c	59±19b
IMP (%)	66±6	53±13ab	59±11a	49±13b	55±14a

Diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$). Controle (Botu-Sêmen®), Tratado (adição de colesterol).

Os resultados demonstram que a incorporação de CLC à membrana plasmática confere maior resistência aos espermatozóides de garanhões *"bad cooler"* à refrigeração, fato caracterizado através parâmetros de cinética e integridade de membrana encontrada neste estudo. Estes resultados corroboram com os achados de Torres et al., 2006 e Crespilho et al., 2012 que observaram parâmetros de motilidade e integridade de membrana superiores nos espermatozóides refrigerados a 5ºC por 24 horas e tratados com colesterol. A refrigeração promove diminuição da atividade enzimática e do metabolismo celular. A cada 10ºC de temperatura diminuída ocorre queda de 50% da demanda metabólica espermáticas (Houston, 2001), ou seja, os espermatozóides armazenados a 5ºC encontram-se em torno de 12% do seu metabolismo a temperatura corpórea contra 25% a 15ºC. Os espermatozóides refrigerados a 5ºC sofreram menor desgaste energético e provavelmente este fator tenha influenciado para os melhores resultados observados no grupo tratado e refrigerado a 5ºC em relação ao grupo tratado e refrigerado a 15ºC.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de CLC promove aumento na qualidade espermática de garanhões *"bad cooler"* submetidos à refrigeração. A refrigeração a 5ºC associada com o tratamento de CLC constitui uma opção a ser empregada para essa população de garanhões.

AGRADECIMENTOS: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro e à empresa Botupharma pela doação dos diluentes Botu-Sêmen®.

REFERÊNCIAS

Crespilho AM.; Spizziri BE; Meyers M; Graham JK., 2012 (In Press). The Effect of Cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5ºC. Journal of Equine Veterinary Science.

Crockett EL., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. American Zoologist; 38:291-304.

Darin-Bennett A; White IG., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology; 14:466-470.

Houston PL., 2001. *Chemical Kinetics and Reaction Dynamics*. Mineola, NY: Dover Publications; pp. 34–90.

Moran DM; Jasko DJ; Squires EL; Amann RP., 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. Theriogenology, 38:999-1012.

Pimentel CA; Carneiro GF., 2008. Biotécnicas aplicadas à Reprodução de Equinos. In: Gonçalves BDG, Figueiredo RF, Freitas VJF. 2ªed. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Roca, 145-159.

Torres P; Serres C; Gomez-Cuétera C; Santiago I; Mateos E; Álvarez AL., 2006. Effect of cholesterol--loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. Animal Reproduction Science; 94:148-151.

DESCRIPCION CROMOSOMICA EN DOS PADRILLOS EMPARENTADOS

Chromosomal description in two related stallions

***Hynes V*[a]; Muñoz L[a], Ferré DM[a], Saldeñaa E[a], Gorla N[a, b]**

[a]Genética, Área de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales FCVA , Universidad Juan Agustín Maza, Acceso este, lateral Sur 2245, Mendoza, Argentina.[b]CONICET. tel- fax 02961-4056200-209. Email: valenhynes@hotmail.com

RESUME

Cryptorchidism is an anomaly of the reproductive system of mammals, and leads to a failure of the normal descent of the testes in males. Testicular descent is influenced by both genetic and non genetic factors. Two related stallions have been the primary object of this study one of them, the son, with criptorchidism unilateral. Conventional cytogenetic analysis by karyotyping has been the primary tool used to investigate these horses. The two stallions studied had normal karyotype 64, XY. There were no chromosomal rearrangements that could provide information on the possible location of candidate genes involved in equine cryptorchidism.

INTRODUCCION

Diferentes causas pueden conducir a fallas reproductivas en equinos. Sin embargo, un factor comúnmente pasado por alto es un cromosoma o un cariotipo anormal. Cuando se analizan cromosomas de equinos para la búsqueda de alteraciones, los cromosomas se aparean de acuerdo a su tamaño, morfología y patrón de bandas dentro de un cariotipo estandarizado (ISCNH, 1997). El criptorquidismo es una anomalía que afecta el desarrollo del sistema reproductivo de los mamíferos, y conduce a una falla del descenso normal de los testículos en los machos. El criptorquidismo se clasifica de acuerdo a la localización del testículo retenido, en inguinal, abdominal completa e incompleto. La mayoría de los casos de criptorquidismo son unilaterales (Hayes, 1986). El 2 al 8 por ciento de los caballos son criptorquidos, con prevalencia diferente según las razas resultando en posible infertilidad y menor rendimiento por inducción de dolor en los cuartos traseros (Diribarne *et al*., 2009). Las alteraciones del desarrollo sexual causan sub/infertilidad en caballos, el análisis citogenética convencional mediante un cariotipo es la primera herramienta para investigar estos casos (Lear y McGee, 2012). Si se consideran las estructuras anatómicas, la secreción hormonal, y el tiempo de descenso de los testículos, el modelo equino está bien adaptado para estudios comparativos con humanos. En humanos se han detectado anomalías cromosómicas en pacientes con hipospadias y criptorquidismo, y la co- ocurrencia de ambas está asociada con riesgo aumentado de anomalías cromosómicas (Moreno García y Miranda, 2002), significando la importancia de realizar investigaciones citogenéticas en estos casos. El objetivo de este estudio fue investigar 2 equinos emparentados, padre e hijo, este último con criptorquidismo unilateral izquierdo para lograr la descripción cromosómica y aportar a las causas genéticas de esta anormalidad reproductiva.

MATERIALES Y METODOS

Caso 1: equino criollo de 13 años, que ha tenido 2 hijos con criptorquidia y 26 crías normales. Caso 2: equino mestizo de 4 años, criptórquido, que nunca ha dado servicio y es hijo del caso 1. En ambos casos se realizó el examen objetivo general y reproductivo. En el caso 1 se observaron, palparon y midieron ambos testículos, y en el caso 2 se realizó además ecografía transrectal para la localización del testículo retenido. Estudios citogenéticos: Se realizó la extracción de sangre periférica heparinizada para efectuar cultivos en suspensión de linfocitos (Buckton y Evans, 1973 mod.). Cada cultivo consistió en: 0,8 ml de sangre heparinizada, 7,5 ml de Medio de Cultivo Ham F10, 1,5 ml de Suero Fetal Bovino, 0,3 ml de Fitohemoaglutinina, 0,04 ml de estreptomicina- penicilina. Se cultivaron en estufa a 37ºC durante 72 h. Se detuvo el cultivo con Colchicina, se agregó solución hipotónica de Cloruro de Potasio (0,075 M) y se fijó en Carnoy frío. Se extendieron gotas en portaobjetos y se efectuó coloración convencional con Giemsa al 10% y bandas G. Se procedió a la observación microscópica de metafases, se tomaron como mínimo 10 microfotografías, se armó el cariotipo de cada metafase fotografiada, realizándose, según necesidad, la medición milimétrica de los brazos de los brazos p y q. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a normas de bioseguridad y bienestar animal.

RESULTADOS

En el caso 1 no se encuentran alteraciones morfológicas en el tracto reproductivo. Los testículos presentan ubicación anatómica y morfología normal. En la figura 1 se presenta la foto del testículo externo (155 por 108 mm) que se observa en el caso 2 y la fotografía de la ecografía del testículo retenido, el mismo se encuentra móvil en el retroperitoneo y mide 32 por 43,4mm. En la figura 2 (A) se presenta el cariotipo del padrillo 1 y en la figura 2 (B) el del padrillo 2 (criptórquido). Ambos casos, exhiben un total de 64 cromosomas incluyendo, 13 pares de cromosomas metacéntricos o submetacéntricos y 18 pares de autosomas acrocéntricos, más un X submetacéntrico grande, y un cromosoma Y que es el más pequeño del complemento cromosómico (Figura 2 A y B).

Figura 1. Foto del testículo externo del padrillo 2 y foto ecografía del testículo abdominal.

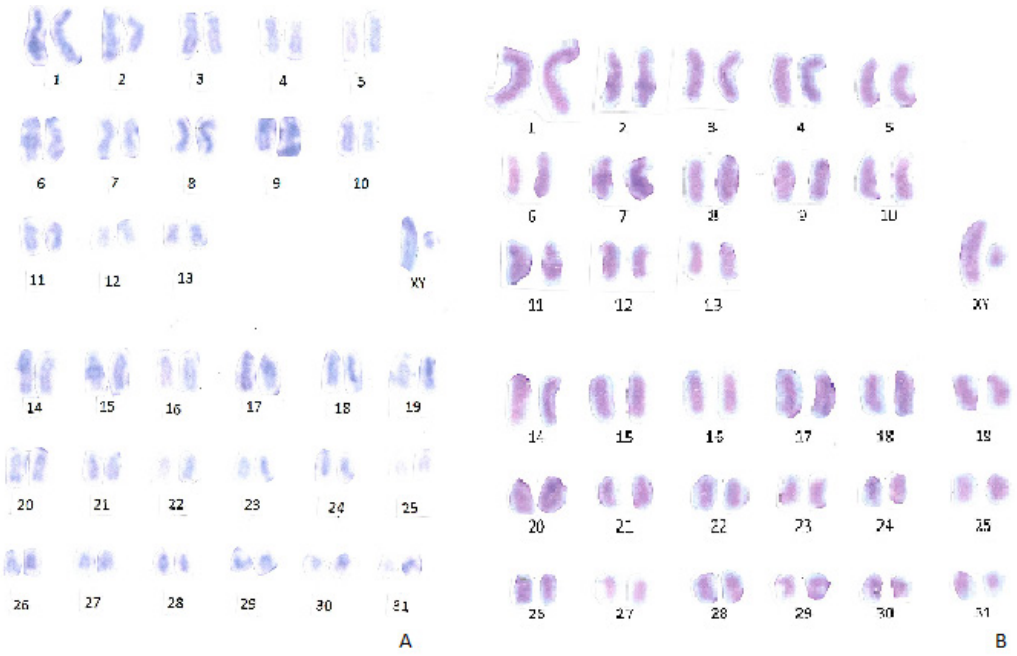


Figura 2: Cariotipo del padrillo 1 (A) y cariotipo del padrillo 2 (B).

DISCUSION

La mayoría de las muestras que se someten a cariotipo proviene de equinos con rendimiento reproductivo bajo. La incidencia de alteraciones cromosómicas en la población equina general es desconocida, pero hay algunos estudios sistemáticos realizados (Bugno *et al*., 2007). Algunos trabajos han estudiado la asociación ente los varios genes candidatos y el desarrollo de criptorquidismo equino (Diribarne *et al*., 2009), genes involucrados en el desarrollo de los testículos como los de la regresión del ligamento suspensorio craneano, genes de la regresión de los conductos Mullerianos, del desarrollo del gubernaculum y del nervio genitofemoral. La detección de alteraciones cromosómicas en diferentes situaciones clínicas como las estudiadas en el presente trabajo han permitido la localización de los genes involucrados, presentes en las regiones cromosómicas rearregladas. Las mutaciones en los genes INSL3 y LGR8 han sido identificados como responsables de criptorquidismo en humanos (Ferlin *et al*., 2003).

CONCLUSIONES

Los dos padrillos, padre e hijo, estudiados presentaron cariotipo normal 64, XY, sin rearreglos que pudieran aportar información a la posible localización de genes candidatos implicados. La presencia de criptorquidismo hace sospechar en causas genéticas, con posible participación de un gen recesivo más que dominante, aunque no se descarta una herencia poligénica. En casos de subfertilidad e infertilidad la realización de estudios citogenéticos puede ser una herramienta más en la búsqueda de las causas del criptorquidismo.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo fue posible gracias a un subsidio de la Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, y al CONICET, Argentina.

REFERENCIAS

Buckton K; Evans H., 1973. Method for the Analysis of Human Chromosome Aberrations. WHO Publications, Ginebra, Suiza.

Bugno M; Slota E; Koscielny M, 2007. Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. Schweiz Arch Tierheilkd, 149(5): 227-232.

Diribarne M; Vaiman A; Pechayre M; Pailhoux E; Mata X; Guerin G; Chaffaux S., 2009. Polymorphism Analysis of Microsatellites Associated with Seven Candidate Genes for Equine Cryptorchidism. J. Equine Vet. Sci. 1, 37-41.

Ferlin A; Simonato M; Bartoloni L; Rizzo G; Bettella A; Dottorini T, et al., 2003. The INSL3-LGR8/great ligand-receptor pair in human cryptorchidism. J Clin. Endocrinol. Metab. 88, 4273-4279.

Hayes HM. 1986.Epidemiological features of 5009 cases of equine cryptorchidism. Equine Vet J 18:467–471.

ISCNH ,1997. International System for Cytogenetic Nomenclature of the domestic Horse, Bowling A. T; Breen ; Chowdhary B P; Hirota K; Lear T; Millon L V; Ponce de Leon F A; Raudsepp T; Stranzinger G. (Committee), Chromosome Research 5: 433-443.

Lear TL; McGee RB, 2012.Disorders of Sexual Development in the Domestic Horse, *Equus caballus* Sex Dev. ;6(1-3):61-71.

Moreno-Garcia M; Miranda EB. 2002. Chromosomal anomalies in cryptorchidism and hypospadias. J Urol 2002;168:2170–2.

EVALUATION OF VIABILITY OF EQUINE SEMEN STORED IN DIFFERENT COOLED CONTAINERS FOR TRANSPORT

Evaluacion de la viabilidad del semen equino refrigerado en diferentes contenedores para el transporte

Avaliação da viabilidade do sêmen equino armazenado em diferentes recipientes refrigerados para transporte

***Maciel AC*[1]*; Camargo VDeA*[2]*; Fiala Rechsteiner S*[3]**

*[1]Mestrando PPGMAE UFRGS (*acm_medvet@hotmail.com/alissonceccatto@hotmail.com*);[2] Acadêmico Medicina Veterinária – UFRGS (*v.camargo.rs@hotmail.com*) [3] Professora Adjunta – HISTOREP - Departamento de Morfologia - IB/UFPel (*sandrafiala@yahoo.com.br*)*

RESUME

This study aimed to verify the effectiveness of a thermal polyethylene container to transport equine cooled semen for up to 8 hours. Five stallions collected twice a week were used. Semen was diluted 1:1 with skim milk, and divided into four aliquots. In the control group (CG) semen was analyzed immediately after dilution (0h). In the other groups, semen was held for eight hours (8h) in: Equitainer ® (GE), Botuflex ® (GB) or thermal polyethylene container (GTP). The parameters to check the semen viability were motility, vigor and membrane integrity which was tested by CFDA/PI staining as well as the membrane functionality, by HOST. There was no difference between groups when assessing the membrane functionality (P = 0.0716) and membrane integrity (P = 0.3836). There was difference in motility (P = 0.0000) and vigor (P = 0.0004) comparing the GC (68.8 and 2.5% respectively) and the treatments GE (47.1% and 2.0), GB (44.7% and 2.0) and GTP (44.2% and 1.9). There was no damage to equine semen when thermal polyethylene container was used for conservation of cooled semen, then thermal polyethylene container can be indicated as an alternative to transport equine semen cooled for up to eight hours.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas adequadas para a conservação e armazenagem de sêmen permite uma melhor utilização dos animais de alto valor, além de possibilitar a utilização da genética de animais que não podem, temporária ou permanentemente, serem utilizados para a reprodução, além de permitir o transporte do sêmen por longas distâncias (PARKS, GRAHAM, 1992). O sêmen do garanhão pode ser armazenado por um determinado período de tempo com a sua fertilidade mantida (MALMGREN, 1998). Há, no entanto, vários fatores cruciais que influenciam as taxas de prenhez com o sêmen armazenado e transportado, tais como a qualidade do sêmen, procedimentos de manipulação, a escolha do diluente, a taxa de resfriamento, temperatura de armazenamento e sistema de transporte (KAYSER et al., 1992; MALMGREN et al., 1994). Analisando o atual mercado de recipientes refrigerados para o transporte de sêmen, este estudo teve como objetivo verifi-

car a eficácia de um recipiente de Polietileno para o transporte de sêmen equino resfriado por um período de 8 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco garanhões com fertilidade comprovada, pertencentes à Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, todos apresentando boa condição corporal e com idades variando entre 5 e 13 anos. Todos os animais se encontravam em atividade sexual, com produção espermática estabilizada, em um regime de, no mínimo, duas coletas semanais, o que resultou em 53 ejaculados no total. As coletas de sêmen foram realizadas empregando-se o método de vagina artificial, modelo Hannover. Imediatamente após cada coleta, a fração gel era removida, e o sêmen então diluído na proporção 1:1 com leite desnatado, e dividido em quatro alíquotas. O sêmen foi analisado como grupo controle logo após a coleta - 0 hora (GC). As outras três alíquotas foram mantidas em três diferentes equipamentos refrigerados por oito horas: Equitainer® (GE), Botu-Flex® (GB) ou Recipiente de Polietileno Térmico (GPT) (Figura 01). O sêmen era colocado dentro do GPT em um tubo Falcon, junto com um envelope de gelo reciclável. A curva de resfriamento foi realizada e a tempertura minima chegou a 6ºC nos meses de inverno e 19ºC durante o verão.

Figura 01 - Recipiente de Polietileno Térmico (GPT)

Para estimar a viabilidade espermática foram avaliados a motilidade e vigor em microscópio óptico, por um técnico experiente, para a integridade de membrana foi utilizado o teste com corantes fluorescentes CFDA/PI, e para a funcionalidade de membrana foi utilizado o teste hiposmótico (HOST). A análise estatística foi realizada através da estatística descritiva, ANOVA e a comparação de médias realizada utilizando diferença mínima significativa (DMS).

RESULTADOS

Houve diferença na motilidade (P=0,0000) e vigor (P=0,0004) comparando o GC (68,8% e 2,5 respectivamente) e os tratamentos GE (47,1% e 2,0), GB (44,7% e 2,0) e GPT (44,2% e 1,9). Não houve diferença entre os grupos quando se avaliou a funcionalidade de membrana (P=0,0716) e integridade de membrana (P=0,3836), sendo que os valores obtidos estão listados na Tabela 01.

Tabela 01 - Valores (%) obtidos de Funcionalidade de Membrana (HOST) e Integridade de Membrana (CFDA/PI) dentro de cada grupo estudado.

	GC	GE	GB	GPT
Integridade de Membrana	45,1	41,7	39,9	40,2
Funcionalidade de Membrana	72,7	71,2	69,2	69,3

DISCUSSÃO

As avaliações *in vitro* do sêmen são de grande importância para a análise das características relacionadas com a capacidade fertilizante do espermatozóide, tais como motilidade, integridade morfológica, funcionalidade de membrana e integridade da membrana plasmática (TERRACIANO, 2008). No entanto, segundo Althouse & Hopkins (1995), a manutenção da motilidade não indica necessariamente completa integridade celular e integridade de membrana plasmática, o que é de importância crucial para o funcionamento e capacidade fertilizante dos espermatozóides. No presente experimento, após o armazenamento não foram observadas diferenças na qualidade do sêmen quando se comparou os três recipientes, o que demonstra que o recipiente de polietileno pode ser uma alternativa recomendável para o transporte de sêmen eqüino por até 8 horas. Busca-se com este recipiente diminuir os custos do transporte por um período curto de tempo, assim como facilitar o manejo do sêmen, uma vez que o recipiente é pequeno e prático. Testes de fertilidade "*in vivo*" com o sêmen armazenado serão realizados, bem como outros materiais para a confecção do Recipiente Térmico serão testados.

REFERÊNCIAS

Althouse, G.C.; Hopkins, S.M. 1995 Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. Theriogenology, v.43: 595-603,.

Kayser, J.P.; Amman, R.P.;, Shideler, R.K.; Squires, E.L.; Jasko, D.J.; Pickett, B.W. 1992 Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology, v.38, p.601-614,.

Malmgren, L. 1998 Effectiveness of two systems for transporting equine sêmen. Theriogenology, v.50, p.833-839,.

Malmgren, L.; Op den Kamp, B.; Wöckener, A.; Boyle, M.; Colenbrander, B. 1994 Motility, velocity and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. Reprod Dom Anim 29: 469-476.

Parks, E.J.; Graham, J.K. 1992 Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, v.38, p.209-222,.

Terraciano, P.B. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS, 2008. 54p.

Andrología # 28

CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO EN MEDIUMFLATPACKS: EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD DE YEGUAS USANDO INSEMINACIÓN INTRAUTERINA PROFUNDA

Cryopreservation of equine semen in mediumflatpacks: effect on fertility of mares using deep intrauterine insemination

Matamala F*[1]*; González R*[2]*; Briones M*[1]*; Santa María A*[1]*; Rodríguez-Martínez H*[3]*; Saravia F*[1]*

[1]Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile; [2]Haras Nacional, Valdivia, Chile; [3]Departamento de Medicina Clínica y Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Linköping, Linköping, Suecia

** Teléfono: +56-42-208834; Fax: +56-42-270212; e-mail: fsaravia@udec.cl*

RESUME

In equine reproduction attempts to increase the use of reproductive biotechnologies such as semen cryopreservation has been limited by the variability on results and the lack of standardized protocols to freeze stallion semen. The aim of the present study was to ascertain the effect of a new freezing container, MeFP (2 mL) on pregnancy rates, compared to the commonly used medium straws (0.5 mL) when semen was frozen from two stallions and used after thawing to inseminate 29 mares using deep intrauterine AI post-ovulation. Although pregnancy rates were numerically higher in mares inseminated with semen packed in medium straws (93.7%) compared to doses packed in MeFPs (77%), use of an equivalence test (Dunnettand Gent, 1977) could not demonstrate any significant difference been, implying that the MeFP was a valuable option to manage one single dose for equine AI, compared to the more cumbersome medium straws.

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de las técnicas de congelación de semen equino se han utilizado diferentes tipos de envases, entre ellos las pajuelas de plástico en distintos tamaños y para diferentes volúmenes, mini-pajuelas (0,25mL) pajuelas medianas (0,5 mL), maxi-pajuelas (5 mL) y Macro tubos (10 mL). El número de espermatozoides envasados por pajuela generalmente es bajo, lo que obliga a utilizar varias pajuelas de 0,25 ó 0,5 mL para completar una dosis inseminante (Maxwell y Johnson, 1999). Por otro lado las maxi-pajuelas tienen una relación superficie-volumen criobiologicamente inadecuada, ya que no permite una transmisión uniforme de la temperatura a través de la muestra, facilitando la recristalización y posterior daño a los espermatozoides. Recientemente se ha desarrollado para el uso en semen porcino, un novedoso modelo de envase plástico de 5 mLFlatPack™ (FP) (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000b) y de 0,5 mLMiniFlatPack™ (MFP) (Saravia *et al*., 2005) (Figura 1). Consiste en un envase de plástico plano, detereftalato de polietileno (PET), sus dimensiones son 0,2 mm de espesor, 30 cm de longitud y 22 mm de ancho, cuando se llena con

semen, su espesor alcanza 1 mm (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b). El uso de estos envases han demostrado producir una congelación más homogénea, proporcionandosuperior calidad post descongelación en comparación con las pajuelas (Eriksson*et al*., 2001; Saravia *et al*., 2005). Las razones para esta mejor "criosupervivencia" es producto de su mayor relación superficie volumen (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000a) desencadenando una más rápida y homogénea difusión en la formación/disolución de hielo en muestras de semen durante el proceso de congelación-descongelación (Woelders *et al*., 2005), y también una mayor disipación de calor durante los cambios de fase libre de agua comparada con las pajuelas de 0,5 mL (Eriksson*et al*., 2001). Su uso marca un efecto positivo en la integridad de membrana y en la motilidad progresiva de espermatozoides porcinos post-descongelación, mejorando la calidad espermática en comparación con los envases estándar (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000b; Eriksson*et al*., 2002). Al usar las MFPs como envase para la criopreservación, el número de espermatozoides puede ser inseminado como una dosis única, mediante la inseminación artificial intrauterina profunda (IA-IUP) donde se han obtenido excelentes resultados (Eriksson *et al*., 2002; Ekwall *et al*., 2007; Saravia *et al*., 2010). Según nuestra información no existen reportes del uso de MFPs para la congelación de semen equino. Nuestro objetivo es evaluar el efecto de usar este envase con capacidad para 2 mL (MeFPs) versus semen congelado en pajuelas medianas (0,5 mL) sobre la fertilidad de yeguas inseminadas mediante IA-IUP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron dos potros sexualmente maduros (Zangersheide y de Silla Argentino, 10 y 17 años respectivamente) con fertilidad probada en temporadas anteriores. Se inseminaron 29 yeguas entre 4 a 16 años de diferentes razas. Potros y yeguas fueron asignados totalmente al azar a cada tipo de envase usado en las IAs, MeFPs o pajuelas. El estudio se realizó con los datos disponibles provenientes del "Haras Nacional". El semen se colecto con vagina artificial modelo INRA (IMV, L´Aigle, Francia). Solo fueron utilizados eyaculados que presentaron al menos 70% de motilidad post colección. Luego el semen se mezcló 1:1 en diluyente Kenney y luego fue centrifugado (400g x 15 minutos). Posteriormente se eliminó parcialmente el sobrenadante, dejando aproximadamente un 20-30%. Inmediatamente el pellet fue incorporado con el sobrenadante agitando suavemente los tubos. Una vez que el semen fue homogenizado totalmente se adiciono el diluyente de congelación (EquiPro®, Minitübe) en la cantidad calculada para obtener una concentración de 250×10^6 spz/mL. El semen se envasó ya sea en: pajuelas de 0,5 mL o en MFPs modificadas para contener 2 mL (MeFPs).

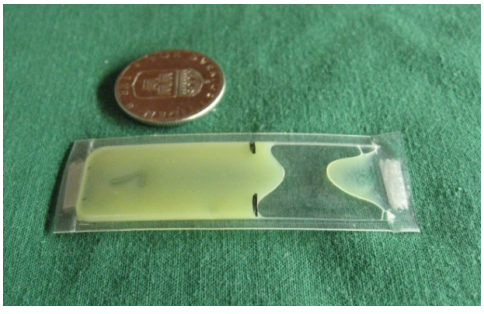


Figura 1. MiniFlatPack™ 0,5 mL(Foto: Fernando Saravia)

Los envases se colocaron sobre una rampa de congelación que se introdujo en el refrigerador a 4°C por 20 min. Luego estas fueron trasladadas a una caja de styrofoan (isotér-

mica) en la cual previamente se depositó nitrógeno líquido(NL) hasta alcanzar una altura aproximada de cinco a seis cm. en donde los envases fueron expuestos sobre vapores de NL a una altura de cuatro cm sobre el nivel de NL por 20 min. Posteriormente las muestras fueron directamente sumergidas en NL y luego ser trasladadas a un termo *ad hoc* para su almacenamiento hasta ser requeridas para la IA. El estro y ovulación de las yeguas fueron sincronizados con un protocolo en base a $PGF_{2\alpha}$ y hCG. Las yeguas fueron evaluadas post hCG a las 24, 36, 42 y cada 4 horas hasta ocurrida la ovulación. Las dosis de ambos envases se descongelaron en un baño maría a 37ºC por 60 segundos. Solo se inseminaran dosis que presenten al menos 35% de motilidad progresiva post descongelación. Todas las inseminaciones se realizaron post-ovulación utilizando el método de IA-IUP, en el cuerno ipsilateral al ovario donde se produjo la ovulación. El diagnostico de gestación se realizó ecográficamente entre los días 18-24 y se repitió entre los días 45-50 post IA. Se utilizo la prueba de equivalencia descrita por Dunnett y Gent (1977) para demostrar que el uso de ambos tipos de envases no incidió en la fertilidad de las yeguas.

RESULTADOS

Considerando todas las yeguas inseminadas, (n=29), se preñaron 25 (86,2%). Se inseminaron 16 yeguas usando semen envasado en pajuelas y 13 fueron inseminadas con semen congelado en MeFPs. Las tasas de preñez fueron mayores en las yeguas inseminadas con dosis congeladas en pajuelas, 15/16 (93,7%) en comparación a las inseminadas con semen envasado en MeFPs, 10/13 (77%).

DISCUSIÓN

Para la congelación de semen equino la utilización ya sea de pajuelas medianas o MFPs no incide en las tasas de preñez de yeguas al usar IA-IUP post ovulación. El aumento del uso de semen descongelado de potro, ha incrementado el número de IAs en la industria equina (Moore *et al.,* 2005). Aunque aún existe una gran variabilidad en las tasas de preñez, debido entre otros factores a que no existe una estandarización de los protocolos de congelación de semen, tiempo de inseminación, sitio de inseminación, dosis inseminante, selección y manejo de la yegua (Colenbrander *et al.,* 2003; Loomis, 2001). Además de la extrema variabilidad individual en la criopreservación de semen. Los MFPs han sido diseñados y utilizados con excelentes resultados *in vitro* en semen porcino (Erikksson *et al*., 2001; Saravia *et al*., 2005). Los resultados de laboratorio de esos estudios indican que los MFPs presentan ventajas criobiológicas versus las pajuelas medianas. Este envase ha resultado ser una alternativa confiable para la congelación-descongelación de semen de verraco bajo condiciones comerciales de IA (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b; Eriksson *et al.,* 2002; Saravia *et al.,* 2010; Rodriguez-Martinez y Wallgren, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan valiosa información para la biotecnologías reproductivas en la especie equina. El no encontrar diferencias significativas de fertilidad entre los dos tipos de envaseshacen que el MeFP se vislumbre como un envase a considerar en la criopreservación de semen equino, debido a sus mejores características criobiológicas sumado a su fácil manipulación y al hecho de que su uso es mas practico en terreno ya que solo se requiere de la descongelación de un MeFPs, ya que este contiene el total de la dosis a inseminar.

CONCLUSIONES

El semen congelado en este nuevo envase (MeFP, 2 mL) mantiene las tasas de preñez en porcentajes comparables al semen congelado en pajuelas medianas de 0,5 mL.

REFERENCIAS

Ekwall H., M. Hernández, F. Saravia and H. Rodríguez- Martínez. 2007. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar semen frozen in medium-straws and MiniFlatPacks. Theriogenology. 67(9): 1463–1472.

Eriksson, B.M. and H. Rodríguez-Martínez. 2000a. Deep-freezing of boar semen in plastic film 'cochettes'. ZentralblattfürVeterinärmedizinReihe A 47(2), 89-97.

Eriksson, B.M and H. Rodriguez-Martine. 2000b. Effect of freezing and thawing rates on the post thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straw. Anim. Repro. Sci. 63(3-4): 205-220.

Eriksson, B.M., H. Petersson and H. Rodríguez-Martínez. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. Theriogenology. 58(6): 1065-1079.

Maxwell, W.M.C. and L.A. Johnson. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. Theriogenology. 52(8): 1353-1362

Saravia, F., M. Wallgren, S. Nagy, A. Johannisson and H. Rodríguez-Martínez. 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. Theriogenology. 63(5): 1320–1333.

Saravia, F., M. Wallgreen and H. Rodríguez-Martínez. 2010. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. Anim. Repro. Sci. 117(3-4): 279–287.

Woelders, H., A. Matthijs A, C.A. Zuidberg and A.E. Chaveiro. 2005. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. Theriogenology. 63(2): 383–95.

Andrología # 29

COMPARACIÓN DE DOS COLOIDES COMERCIALES EN SEMEN EQUINO CONGELADO: EQUIPURE® vs. PERCOLL®

Comparison of two commercial colloids in equine frozen semen: EquiPure® vs. Percoll®

Morikawa MI*; Guillen N; Eusebio Centeno J; Von Meyer M; Llorente J; Herrera C.

Cría Tanoira Embriones, Ruta 28 km. 6.5, Pilar, Buenos Aires, Argentina.
**mariainesm84@hotmail.com*

RESUME

Centrifugation in colloids is a very effective procedure in equine assisted reproduction. This technique allows the selection of the best quality sperm. The objective of our project is to compare two commercial colloids in terms of progressive motility, morphology and the HOS test in frozen-thawed equine semen samples. Fourteen ejaculates of five stallions were used. Each sample was centrifuged in 1ml Percoll® and 1ml EquiPure®. Before and after centrifugation, progressive motility, membrane integrity (HOS Test) and morphology were compared between treatments. Centrifugation in Percoll® improved the percentage of motile progressive in more samples than the EquiPure®. Also there was a significant increase in the percentage of sperm with intact membrane (HOS test) and there were no significant differences in morphology in either treatment. These results indicate that in our experiment, centrifugation in Percoll® improved more samples of equine post thaw semen than EquiPure®.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha demostrado que la centrifugación de semen equino en coloides permite mejorar la calidad del eyaculado. Esta técnica aumenta la proporción de espermatozoides morfológicamente normales y viables. A su vez mantiene la calidad de la muestra durante más tiempo (Gutierrez-Cepeda et al., 2011). Existen en el mercado diferentes presentaciones comerciales de coloides. El objetivo del trabajo fue comparar la eficiencia de dos de ellos: EquiPure® y Percoll® con respecto a su capacidad para mejorar la calidad del semen de diferentes padrillos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos a tres eyaculados de cinco padrillos, cuyas muestras de semen presentan parámetros normales: % de espermatozoides vivos con Motilidad Progresiva igual o mayor al 45%, % de espermatozoides con morfología normal igual o mayor a 60%, concentración espermática mayor a $100x\ 10^6$ por ml. Las muestras se tomaron desde el mes de Septiembre de 2012 hasta Enero de 2013. El semen fue colectado mediante vagina artificial modelo Missouri utilizando una yegua en estro. Cada una de ellas fue filtrada y se registró

el volumen, la concentración y la motilidad progresiva. Luego fueron diluidas 1:1 con diluyente Kenney. Las muestras fueron congeladas utilizando un medio de criopreservación a base de lactosa, yema de huevo, dimetil-formamida y Kenney con una curva de descenso de temperatura de 10ºC por minuto hasta -15ºC, luego 30ºC por minuto hasta -120ºC (Miragaya et al. 2001), en una congeladora programable. Al finalizar, se sumergieron y mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento del análisis. Una vez descongelada, una muestra de cada salto fue dividida en dos, fue colocada sobre 1ml de Percoll® y 1ml de EquiPure® y fueron centrifugadas 15 min a 350g. Antes y después de la centrifugación en coloide, se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos con motilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la integridad de la membrana mediante el test hiposmótico (HOS). Los resultados obtenidos con los dos tipos de coloides fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y el test de Dunnet para múltiples comparaciones (P<0.01). NOTA: Los autores de este trabajo no presentan interés comercial en ninguno de los dos productos.

RESULTADOS

Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Padrillo	% Motilidad Progresiva			% Hos Test			% Morfologia		
	Control	Percoll	Equipure	Control	Percoll	Equipure	Control	Percoll	Equipure
1	31.67a	76.67b	68.33b	25.67a	47b	29.67a	78,67	78,67	77,67
2	28,33	38,33	35	20.33a	57b	26.67a	86,33	80,33	80
3	36.67a	63.33b	43.33a,b	23,67	31	20,33	75,33	64,33	71,33
4	36.67a	66.67b	38.33a	25a	48.67b	33a	81,33	78	78,33
5	37,5	57,5	55	24,5	32,5	24	75,5	84,5	73,5

Tabla 1. Comparación del efecto de la centrifugación en dos coloides diferentes respecto a la motilidad progresiva, el HOS test y la morfología de cinco padrillos diferentes. Superíndices diferentes indican diferencias significativas en la misma fila para el mismo Test.

La centrifugación en Percoll® permitió mejorar el porcentaje de mótiles progresivos en las muestras de los padrillos 1, 3 y 4 al ser comparadas con el Control. En el caso del EquiPure® solo se vió una mejora estadísticamente significativa en las muestras del padrillo 1. La centrifugación en Percoll® aumentó el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (HOS test) en las muestras de los padrillos 1, 2 y 4 mientras que el EquiPure® no logró mejorar ninguna muestra. No hubo diferencias significativas en cuanto a la morfología comparando los dos coloides.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se comparó el efecto de centrifugar muestras de semen congeladas y descongeladas usando dos coloides comerciales. Uno de ellos, el Percoll® es ampliamente usado en medicina humana y en otras especies de mamíferos superiores (bovinos, porcinos) para mejorar la calidad del semen. Una de las aplicaciones en medicina humana por ejemplo, es separar partículas de HIV en muestras de semen de pacientes seropositivos (Muciaccia B. et al. 2007). En los últimos años el EquiPure® ha sido incorporado en reproducción asistida en equinos. Se ha demostrado que mejora la calidad del semen en cuanto a la motilidad progresiva y la morfología (Macpherson et al., 2002). Según nuestros resulta-

dos el Percoll® logró mejorar los parámetros seminales en un número mayor de padrillos que el EquiPure®. Ninguno de los dos tratamientos mejoró la morfología de las muestras. En nuestro experimento no hubo variación en el volumen de coloide, la velocidad y el tiempo de centrifugación y la concentración de las muestras para todas las repeticiones. Estos parámetros podrían ser modificados para estudiar más en detalle la efectividad de estos dos coloides.

Este trabajo constituye un ensayo preliminar ya que uno de los objetivos fue observar el efecto que produce en el semen sin tener en cuenta la concentración para una dosis inseminante. Son necesarias más pruebas para determinar cuál de los coloides es más efectivo, por ejemplo utilizándolos en una prueba biológica como la inseminación artificial.

CONCLUSIÓN

La centrifugación en Percoll® demostró mejorar la calidad de mayor cantidad de muestras de semen de padrillo post descongelado que el EquiPure®.

REFERENCIAS

Gutierrez-Cepeda, L.; Crespo, F.; Serres, C. Gosalvez, J. (2011) Centrifugación en Coloides Versus centrifugación Simple en semen equino.

M.H. Miragaya, M.G. Chaves, D.M. Neild, C. Berretta, A. Aguero (2001). Artificial insemination using stallion semen cryopreserved with a simple manual method.

Muciaccia B, Corallini S, Vicini E, Padula F, Gandini L, Liuzzi G, Lenzi A, Stefanini M. HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects. Hum Reprod. 2007 Nov;22(11):2868-78. Epub 2007 Sep 12. PubMed PMID: 17855413.

M.L. Macpherson , T.L. Blanchard, C.C. Love, S.P. Brinsko, D.D. Varner.(2002). Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions.

Andrología # 30

ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES DE CABALLOS DE RAZA AZTECA

Fragmentation index on Azteca breed epididymal sperms

Parra-Forero LY*[1a]*; López-Fernández C[2b]; Montiel JA[3c]; Mendoza G[4a]; Pulido S[5a]; Cruz LA[6d]; Guevara-G JA[7e]; García-Contreras A[8a]

[a]*UAM- Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100 Col Villa Quietud. Delegación Coyoacán. C.P 04960. México D.F. Tel: (01-55) 54837039. Email:* lyparraf19@gmail.com, adelfa@correo.xoc.uam.mx. [b]*Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco · C.P 28049, Tel (0034) 914978210, Email:* mariadelcarmen.lopez@uam.es, [c]*CREME Centro de Reproducción y Medicina Equina, Km 37 Carretera Picacho Ajusco, Sto Tomas Ajusco. Tel: (01-55) 54376446 Email:* jersain8@prodigy.net.mx. [d]*Alta Tecnología en Laboratorios S.A de C.V,* www.atlsadecv.com. [e]*Universidad del Valle de México, Col. Ex hacienda de San Juan C.P 14370. Delegación Tlalpan, México, D.F. Tel (01-55) 52385300, Email:* jaggnutricion@yahoo.com.mx.

RESUME

The need to obtain the major profit of the genetics of a stallion, particularly sudden losses, does that the obtaining sperm cells (Spzs) from epididymis does to itself with more frequency, evaluation increasingly demanding and involving new techniques such as SCD (Sperm Chromatin Dispersion test). This study was conducted with 14 epididymides of castrated animals, these were divided in their three segments (caput, corpus and cauda), each of these were washed and Spz`s, they determined the rate of sperm DNA fragmentation (IF) and stained with two stains (DAPI and Wright) which showed no significant difference (P> 0.05). With the IF DAPI caput, corpus and cauda of 23.8, 21.01 and 15.73, with Wright 26.02, 23.5 and 16.52 , which showed no significant differences, with the exception of the Cauda Spzs epididymis (P <0.05). different IF are found in all their three segments of the epididymis of horse being in the cauda epididymis lower than in the other. No differences were found between reading halos sperm fragmentation with DAPI or Wright.

INTRODUCCIÓN

La obtención de espermatozoides (Spzs) de epidídimo es una técnica que permite utilizar material genético de animales de alta calidad. Problemas de muerte repentina, o sacrificio humanitario en esta especie, han generado la necesidad de recuperar los Spzs epidídimales, propiciando su estudio anatomo-fisiologíco, propiedades exocrinas y endocrinas, composición del fluido epidídimal, expresión de genes, actividad de hormonas y proteínas. Así como, aclarando los procesos de maduración, cambios físicos del espermatozoide, regulación de esteroides y capacitación espermática, contribuyendo con ello al desarrollo de medios de preservación de Spzs epidídimales (Papa *et al*., 2008; Malcotti *et al*., 2012). Asimismo, se han desarrollado técnicas de extracción como la aspiración percutánea, utilizada en pacientes azospérmicos (Gorgy *et al*., 1998; O´Connell *et al*., 2002). Por su parte, la integridad del ADN espermático se ha descrito en varias especies (Camaioni *et al*., 1992;

Thuwanut *et al*., 2008), se han utilizado técnicas diversas (Steele *et al*., 1999; Pérez-Cerezales *et al*., 2011) incluida entre ellas la SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) que se basa en la dispersión de la cromatina observada en la cabeza del espermatozoide (López-Fernández *et al*., 2007; Monteiro *et al*., 2012). Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el Índice de Fragmentación de ADN espermático de origen epidídimal en caballos de raza Azteca.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron 14 pares de epidídimos de caballos castrados de raza Azteca, de entre 2 y 3 años de edad. Se identificaron los tres segmentos del órgano (cabeza, cuerpo y cola) los cuales fueron separados con Nylon No.1 (Fig. 1), se lavó con PBS cada segmento (Bruemmer *et al*., 2006). Se recuperó el PBS con Spz, procediendo a la evaluación de la integridad del ADN, utilizando el kit comercial Halomax (Halotech SL, Madrid, Spain: López-Fernández *et al*., 2008). Se obtuvo una muestra de 15 x 10^6 Spz por ml, los cuales fueron colocados en los portaobjetos pre-tratados con agarosa, para posteriormente ser lisados y teñidos con DAPI o con Wright, obteniendo de cada segmento dos portaobjetos. Se contaron 300 Spz, determinando la proporción de células con fragmentación de ADN (Spz fragmentados x 100/300 Spz contados), obteniendo el Índice de Fragmentación (IF). Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizado un diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 2 x 3 usando el paquete estadístico SAS versión 9.3, los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando P<0.05.

RESULTADOS

El IF obtenido en Spz de epidídimo en sus tres segmentos se muestra en la Tabla 1. Existiendo diferencias (P<0.05) entre segmentos. El segmento Cola mostró un valor menor (IF_{co}=16.13), al que los segmentos Cabeza y Cuerpo tuvieron (IF_{ca}= 20.40; IF_{cu}= 20.01 respectivamente). En las Fig. 2 y 3, se muestran los espermatozoides epidídimales teñidos con DAPI, observándose claramente que el halo fue mayor al diámetro de la cabeza en los Spz considerados como fragmentados (A, B, C).

Tabla 1. Índice de fragmentación (IF) de células espermáticas epidídimales obtenidas de los tres segmentos.

Segmento	IF		IF Medio por segmento
	DAPI	Wright	
Cabeza	23.8[a]	26.02[a]	24.90[a]
Cuerpo	21.01[a]	23.5[a]	22.59[a]
Cola	15.73[b]	16.52[b]	16.13[b]
EEM			0.84

Literales distintas en la misma columna muestran diferencias (P<0.05)

Tabla 2. Medias de mínimos cuadrados del Índice de fragmentación (IF) de espermatozoides teñidos con DAPI y Wright.

Tinción	IF
DAPI	20.40
Wright	22.01
EEM	0.69

Medias con distinta son diferentes (P<0,05). EEM: Error Estándar de la Media

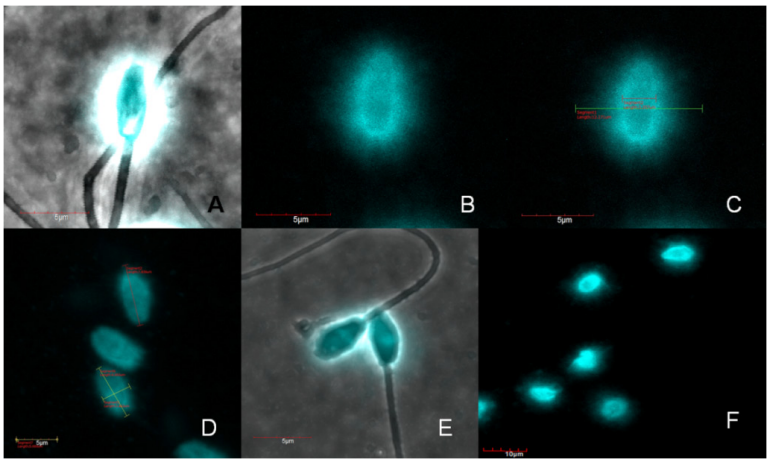


Fig. 1. A. Spz con fragmentación en microscopio de contraste de fases teñidos con DAPI; B. Mismo que el A teñido con DAPI; C. Mismo que el A teñido con DAPI y mediciones de halos; D. Spz sin fragmentación; E. Spz sin fragmentación en microscopio de contrastes de fases teñido con DAPI; F. Técnica SCD teñido con DAPI en 10x

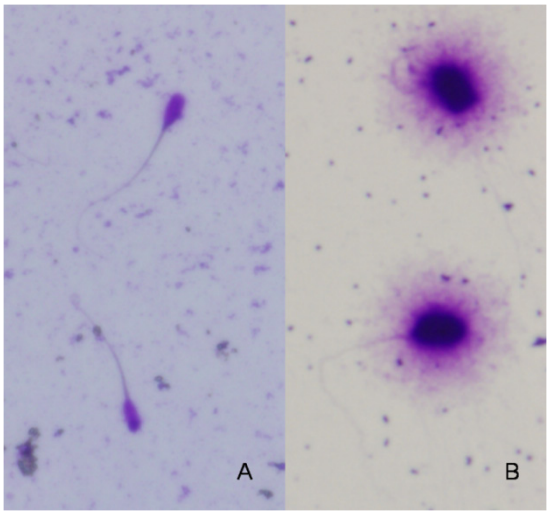


Fig. 2. A. Spz sin fragmentación teñidos con Wrigth, B. Spz fragmentados teñidos con Wrigth.

En la Fig. 2, se incluyeron Spz teñidos con Wright, en donde se observan sin fragmentación (A), en tanto que los fragmentados se muestran en la lamina B. Al analizar el efecto de las tinciones (Tabla 2) no se encontraron diferencias (P>0.05) en la determinación del IF.

DISCUSIÓN

Los caballos utilizados para esta investigación eran prepúberes, lo cual es probable que tuviera un efecto sobre el IF encontrado en los distintos segmentos del epidídimo. Monteiro *et al*. (2007) encontraron daño en ADN espermático de eyaculados y de lavados epidídimales de caballos adultos, conservados con criopreservante de 6.7±1.41% en los primeros, y en los Spz epidídimales de 5.7±1.60%. Estos valores están en al menos un 10% por debajo de los encontrados en este estudio. Es importante señalar que estos valores además son obtenidos de las muestras que fueron descongeladas. Por su parte López-Fernández *et al*. (2007) realizaron evaluaciones del IF de pajillas seminales congeladas de sementales de distintas razas, encontrando que los valores medios al momento de la descongelación oscilaban entre 10.3 y 25%. Estos últimos valores son similares a los encontrados en los Spz de

los segmentos Cabeza y Cuerpo (Tabla 1). Se debe considerar que la fisiología de cada segmento del epidídimo puede propiciar la presencia de ADN fragmentado (Lemazurier *et al*., 2002; Parlevliet *et al*., 2006; Sostaric *et al*., 2008; Martin *et al*., 2010), sin que esto indique un trastorno o daño en el material genético, por lo que mayores estudios en este sentido serán necesarios. En este estudio la utilización de la tinción de Wrigth evidencio resultados tan eficientes como los descritos con fluorocromos (Bonet *et al*., 2006; Enciso *et al*., 2006; Pérez--Llano *et al*., 2006; Gosálvez *et al*., 2011), ya que no se mostraron diferencias significativas.

CONCLUSIÓN

Se encuentran distintos IF en los tres segmentos del epidídimo de caballo, siendo en la cola menor que en las otras. No se encontraron diferencias entre la lectura de los halos de fragmentación espermática con DAPI o con Wrigth. La obtención y evaluación de espermatozoides obtenidas de epidídimo son importantes para avanzar en la reproducción asistida de caballos.

AGRADECIMIENTOS: A Alta Tecnología en Laboratorios S.A de C.V en México por su apoyo para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

Bruemmer JE; Reger H; Zibinski G; Squires E.L., 2002. Effect of storage at 5 ◦C on the motility and cryopreservation of stallion epidídimal spermatozoa. Theriogenology 58, 405–407.

Gosálvez J; González-Martínez M; López-Fernández C;Fernández JL; Sánchez-Martín P., 2011. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. Fertility and Sterility 96 1083-1086.

López-Fernández C; Crespo F; Arroyo F; Fernández JL; Arana P; Johnston SD; Gosálvez J., 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. Theriogenology 68 1240-1250.

Malcotti V; Pelufo V; Bergamo N; Aisen E., 2012 Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. Animal Production Science 52(8) 741-745.

Martin I; Melo CM; Rodrigues MMP; Monteiro GA; Guasti PN; Magalhães LCO; Laufer-Amorim ; Papa FO., 2010. Immunohistochemical localization of estrogen and receptors in adult stallion epididymis Animal Reproduction Science 121S S168–S170

Monteiro GA; Freitas-DellAqua CP; Guasti PN; Sancler-Silvia; Ramires-Neto C; Hartwig FP; Dellaqua JA; Papa FO. 2012. 247 comparison of the DNA fragmentation index between cryopreserved ejaculated sperm and epididymal sperm in stallions Reproduction, Fertility and Development 25 (1) 271-272.

O›Connell M; McClure N; Lewis SEM., 2002. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Hum. Reprod 17 (6):1565-1570.

Papa FO; Melo CM; Fioratti EG; Dell'Aqua JA Jr; Zahn FS; Alavarenga MA., 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. Animal Reproduction Science 107 293–301.

Pérez-Cerezales S; Miranda A; Gutiérrez-Adán A., 2012. Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis. Asian Journal of Andrology 14, 335–337.

Thuwanut P; Chatdarong K; Techakumphu M; Axnér E., 2008.The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. Theriogenology 70 223 - 240

Andrología # 31

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF SPERM CONCENTRATION IN STALLIONS SUBJECTED TO SPERMATIC SELECTION

Comparación de diferentes métodos de concentración espermática en padrillos sometidos a selección espermática

Comparação de diferentes métodos concentração espermática em garanhões submetidos à seleção espermática

***Ramires Neto C*[1], *Monteiro GA*[1], *Lacerda de Resende H*[1], *Zanzarini Delfiol DJ*[2], *Sancler da Silva YFR*[1], *Ozanam Papa F*[1], *Alvarenga MA*[1]**

[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. E-mail: carlosramiresneto@hotmail.com*, Telefone/fax: +55 14 3880-2119.* *[2] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, SP, Brasil. Departamento de Clínica Veterinária.*

RESUMEN

La selección espermática permite mejorar la calidad y la viabilidad del semen equino. Para realizar esta biotecnica es necesario concentrar el semen antes de seleccionarlo. La técnica generalmente utilizada para concentrar el semen equino es la centrifugación, sin embargo esto puede causar daño a la célula espermática. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo comparar las técnicas de filtración y centrifugación para concentrar semen antes de la selección espermática. Para esto, el eyaculado de 9 sementales fue dividido entre tres grupos: Control, donde el semen se diluyó con medio de leche desnatada; Equipure™ Centrifugado, en el que se concentró el semen a través de la centrifugación y luego se realizó la selección de los espermatozoides y Equipure™ Filtrado donde el semen se concentró a través de filtración y se realizó la selección espermática. La cinética espermática se analizó por CASA y la integridad de la membrana plasmática espermática por epifluorescencia, efectuadas después del procesamiento seminal. Se observo una mejoría en la cinética espermática del semen sometido a selección de espermatozoides en comparación con el control, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre las diferentes técnicas de concentración seminal antes de la selección espermática. Se concluye que la selección espermática mejora la calidad del semen equino y que no hay diferencia entre la centrifugación y filtración para concentrar esperma equino antes de la selección de espermatozoides.

RESUME

The spermatic selection enables improves the quality and viability of equine semen. To perform this biotechnique is necessary to concentrate the semen before selecting it. The technique usually used to concentrate the equine semen is the centrifugation; however this can cause damage to the

spermatic cell. Thus, the present study aimed to compare techniques of filtration and centrifugation to concentrate stallion semen before the spermatic selection. For this, the ejaculate of 9 stallions was divided between three groups: control, where semen was diluted with skim milk medium; centrifuged Equipure™, in which the semen was concentrated through the centrifugation and sperm selection was performed; and filtrate Equipure™ where semen was concentrated through filtration and was performed the spermatic selection. The spermatic kinetics was analyzed by CASA and the integrity of spermatic plasmatic membrane by epifluorescence, both performed after seminal processing. Improvement was observed in the semen spermatic kinetics submitted to sperm selection compared to control, however, no significant difference was observed between the different techniques of stallion semen concentration before the spermatic selection. Conclude that spermatic selection improves the spermatic quality of equine semen and that there is no difference between centrifugation and filtration for concentrate equine semen before sperm selection.

INTRODUÇÃO

A utilização do sêmen refrigerado e congelado é amplamente utilizada na reprodução equina, uma vez que maximiza a utilização de garanhões, minimiza os gastos e riscos do transporte de animais para o acasalamento e reduz a propagação de doenças (Varner, 1992; Moore et al., 2004). Entretanto, alguns garanhões possuem baixa qualidade seminal, sendo necessária, nestes animais a aplicação de biotecnologias para aumentar a qualidade, tempo de viabilidade e fertilidade do sêmen, como a seleção de espermatozoides (Macpherson et al., 2003). Concentrar os espermatozoides é uma etapa indispensável antes de realizar a seleção espermática. A técnica normalmente utilizada na remoção do plasma seminal do ejaculado de garanhões é a centrifugação, entretanto esta pode causar danos mecânico à célula espermática (Sieme et al., 2003). Contudo, acreditasse que submeter o sêmen a duas centrifugações, primeiramente para concentrá-lo e posteriormente para a seleção de espermatozoides pode reduzir a viabilidade espermática devido ao choque mecânico. Ramires Neto et al. (2013) demonstraram a eficiência do método de filtração para remover o plasma seminal do ejaculado de garanhões. Desta maneira, este estudo tem com objetivo comparar as técnicas de filtração e centrifugação para concentrar o sêmen de garanhões antes da seleção espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 9 garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, com idade entre 5 e 10 anos. Um total de 3×10^9 espermatozoides foi dividido igualmente entre os 3 grupos estudados:

- Grupo controle (CON) - o sêmen foi diluído com diluente comercial a base de leite desnatado (Botu-sêmen®) até atingir a concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL

- Grupo Equipure centrifugado (EQP C), o sêmen foi primeiramente diluído com diluente comercial a base de leite desnatado (Botu-sêmen®) na proporção de 1:1, centrifugado na velocidade de 600 *x*g (Dell`Aqua Jr et al., 2000) durante dez minutos para remoção do plasma seminal e ressuspendeu-se o pellet com 5 mL do diluente comercial a base de gema de ovo (Botu-crio®).

- Grupo Equipure filtrado (EQP F), o sêmen foi primeiramente diluído com diluente comercial a base de leite desnatado (Botu-sêmen®) na proporção de 1:1, filtrado utilizando o SpemFilter® (Ramires Neto et al., 2013) para remover o plasma seminal e ressuspendeu-se os espermatozoides com 5 mL do diluente comercial a base de gema de ovo (Botu-crio®).

Nos grupos EQP C e EQP F, após concentrar os espermatozoides, foi realizada a se-

leção espermática e para isso, a amostra seminal com 5 mL foi depositada sobre 5 mL do gradiente de densidade Equipure® em um tubo plástico cônico de 15 mL e foi realizada a centrifugação a uma velocidade de 400 *x*g durante 20 minutos. O *pellet* com os espermatozoides selecionados foi aspirado e ressuspendido em diluente a base de leite desnatado (Botu-sêmen®) até atingir a concentração de 100 x 10^6 espermatozoides/mL. Foram avaliados após o processamento seminal os parâmetros de cinética espermática avaliados por CASA (Hamilton Thorne Research - HTM IVOS, USA) e integridade de membrana plasmática através de microscopia de epi-fluorescencia (Harrison & Vickers, 1990). A análise estatística foi realizada através da comparação entre os grupos por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de TUKEY. O nível de significância em todas as análises foi considerado significativo quando $p<0,05$.

RESULTADOS

Como demonstrado na tabela 1, foi observado superioridade ($p<0,05$) na motilidade progressiva dos grupos de seleção espermática (EQP C e EQP F) em relação ao CON. As velocidades de trajeto e linear progressiva foram inferiores ($p<0,05$) nos grupos de seleção espermática em relação ao controle. Não houve diferença ($p>0,05$) na motilidade total e integridade de membrana plasmática entre os grupos.

Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), e integridade de membrana plasmática (IMP) dos grupos CON, EQP C e EQP F após a coleta e processamento seminal.

Groups	TM (%)	PM (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	IMP (%)
CON	66,7±20,5	29,9±10,6a	133,6±13,5a	101,6±11,5 a	67,2±14,7
EQP C	78,8±12,6	48,6±8,4b	113,4±14,6 b	89,2±12,3 b	56,4±15,7
EQP F	82,5±11,4	48,1±9,4b	87,6±10,3 b	83,6±13,9 b	60,0±18,3

[a,b]Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente ($p<0,05$) CON (grupo controle), EQP F (grupo com espermatozoides selecionados através do Equipure, previamente filtrado), EQP C (grupo com espermatozoides selecionados através do Equipure, previamente centrifugado).

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado melhora significativa da motilidade progressiva do sêmen nos grupos EQP C e EQP F quando comparado ao grupo CON, demonstrando que a técnica de seleção com Equipure®, precedida por métodos de concentração (centrifugação e filtração) auxilia na seleção espermática. Estes achados corroboram com os achados de Morrell et al. (2012) e Papa et al. (2012) que utilizaram o método de centrifugação para concentrar o sêmen previamente a seleção. Biotecnologias, como a seleção espermática em equinos, têm demonstrado, nos últimos anos, significativos avanços no processamento seminal (Morrell, 2012). Entretanto, alguns garanhões não resistem ao choque mecânico causado pela centrifugação que antecede o processo de seleção espermática (Sieme et al.,2003) . Com isso, acreditava-se que a utilização da filtragem para concentrar os espermatozoides evitaria que o sêmen fosse centrifugado duas vezes e assim reduziria os dados aos espermatozoides e consequentemente aumentaria a qualidade do sêmen submetido à seleção de espermatozoide. Entretanto, no presente estudo não foi observada diferença entre a técnica de filtração e centrifugação para remoção do plasma seminal antes da seleção espermática em garanhões com boa qualidade espermática, corroborando com Ramires Neto et

al. (2013). Apesar disso, a filtração seminal pode ser considerada ainda uma alternativa eficiente na concentração espermática, prévia ao processo de seleção, principalmente em garanhões subférteis e com baixa resistência ao choque mecânico, sendo necessários mais estudos nesta área.

CONCLUSÃO

Independente do método de concentração espermática utilizado, a seleção espermática com gradiente de densidade Equipure® demonstrou melhora na qualidade seminal de garanhões.

REFERÊNCIAS

Brinsko S.P.; Varner D.D., 1992. Artificial insemination and preservation of semen. Vet Clin N Am. 8, 205-18.

Dell'aqua Jr J.A.; Papa F.O.; Alvarenga M.A.; Zahn F.S., 2001. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine semen. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 25, 458-460.

Harrison R.A.P.; Vickers S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 88, 343–52.

Macpherson M.; Blanchard T.L.; Love C.C.; Brinsko S.P.; Thompson J.A.; Varner D.D., 2003. Use of a Silane-Coated Silica Particle Solution to Enhance Semen Quality of Stallions. In: 49TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, New Orleans, Louisiana. 347-349.

Morrell J.M., 2012. Stallion sperm selection: past, present, and future trends. Journal of Equine Veterinary Science. 32, 436-440.

Ramires Neto C.; Monteiro G.A.; Soares R.F.; Pedrazzi C.; Dell`Aqua Jr J.A.; Papa F.O.; Alvarenga M.A., 2013. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. Journal of Equine Veterinary Science. 33, 40-43.

Sieme H.; Martisson G.; Rautterberg H.; Alter K.; Aurich C.; Petzold C., 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. Reprod. Domest. Anim. 38, 134-140.

Papa P.M.; Maziero R.R.D.; Hartwig F.P.; Lisboa F.P.; Dell`Aqua Jr J.A., Alvarenga M.A.; Guasti P.N.; Landim-Alvarenga F.C.; Papa F.O., 2012. Effect of density gradient on sperm parameters os stallion frozen semen. Journal of Equine Veterinary Science. 32, 505. 6th ISSR Abstract.

EFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE EL ESTADO REDOX DE SEMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

Effect of seminal plasma on the redox state of cryopreserved stallion semen

***Restrepo GB*[1*]; *Pizarro EL*[2]; *Usuga AS*[3]; *Echeverry JZ*[4]; *Rojano B*[5]**

[1, 2, 3] Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 No 7-151, Medellín, Colombia.
*[4, 5] Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 59A No 63-20, Medellín, Colombia.*Teléfono: 3197900 Ext. 467; Fax: 3197909; e-mail: grestrepo@elpoli.edu.co; Carrera 48 No 7-151, Medellín, Colombia.*

RESUME

With the objective to determine the effect of seminal plasma on the generation of ROS and lipid peroxidation of cryopreserved stallion semen, the sperm of five colombian creole stallions was cryopreserved using a extender supplemented with 0%, 10% and 20% of seminal plasma. Were evaluated ROS generation, lipid peroxidation and fertility parameters. For statistical analysis were adjusted mixed models and analysis of regression and correlation. Were found post-thaw averages of progressive motility, vitality and integrity of membrane of 37.8% ± 20.2, 50.6% ± 14.6 and 37.8 ± 15.5%, respectively. For fresh and cryopreserved semen supplemented with 0%, 10% and 20% of seminal plasma, the averages of ROS production (RFU) were 13.34 ± 10.7, 16.15 ± 13.5, 17.32 ± 16 and 22.98 ± 19.4, respectively; showing a statistically significant increase (P≤0.05) of ROS production. The averages of lipid peroxidation (nmolMDA / ml) for these same treatments were 0.41 ± 0.25, 0.72 ± 0.37, 0.51 ± 0.29 and 0.47 ± 0.26, respectively; showing a significant decrease (P≤0.05) of lipid peroxidation of semen supplemented with 10% and 20% of seminal plasma. It is concluded that the seminal plasma reduces the lipid peroxidation of stallion cryopreserved semen.

INTRODUCCIÓN

Diferentes técnicas y crioprotectores han sido evaluados para la criopreservación de semen equino (Chenier et al., 1998; Mantovani et al., 2002). Sin embargo, ha persistido su conocida asociación con la baja fertilidad del semen (Ball 2008), por las marcadas alteraciones sobre la movilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides (Ball yVo2001). El estrés oxidativo descrito en los procesos de criopreservación (Devireddy et al., 2002), provoca la peroxidación de los lípidos de membrana (Membrillo et al., 2003) y la pérdida de la actividad de defensa antioxidante del semen (Isachenko V. et al., 2004). La remoción del plasma seminal durante la criopreservación favorece el estrés oxidativo del semen equino, toda vez que la mayoría de su capacidad antioxidante representada por diferentes moléculas y enzimas se encuentra allí (Baumber, Ball 2005). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del plasma seminal sobre el estado redox (producción de EROs y peroxidación lipídica) y la fertilidad potencial de semen equino criopreservado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El semen de cinco equinos de la raza criollo colombiano fue criopreservado mediante un protocolo de congelación rápida. Se utilizó un diluyente a base de leche descremada, 4% de yema de huevo y 5% de dimetilformamida, el cual fue suplementado con los tratamientos de 0%, 10% y 20% de plasma seminal equino. En el semen fresco y criopreservado se evaluó la generación de Especies Reactivas del Oxigeno (EROs) por la metodología de la fluoresceína diacetato -FDA-, la peroxidación lipídica por la técnica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico-TBARS-, la movilidad progresiva por microscopia la vitalidad mediante la técnica de eosina-nigrosina y la integridad de membrana por la prueba hiposmotica (HOST). Para el análisis estadístico se ajustaron modelos mixtos para las variables dependientes producción de EROs y peroxidación lipídica, se realizó un análisis de regresión producción de EROs y se evaluó la asociación entre las variables estudiadas para el semen criopreservado mediante un análisis de correlación de Pearson.

RESULTADOS

El promedio para los parámetros espermáticos del semen fresco fueron: movilidad progresiva 77.5% ± 10.6, vitalidad 79.9% ± 8.74, morfología normal 83.6% ± 5.78, e integridad de membrana 70.4% ± 15.5. Se hallaron promedios post-descongelación de movilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana de 37.8% ± 20.2, 50.6% ± 14.6 y 37.8% ± 15.5, respectivamente. Para el semen fresco y criopreservado suplementado con 0%, 10% y 20% de plasma seminal, los promedios de producción de EROs (URF) fueron de 13.34 ± 10.7, 16.15 ± 13.5, 17.32 ± 16 y 22.98 ± 19.4, respectivamente. Los promedios de peroxidación lipídica (nmolMDA/ml) para estos mismos tratamientos,fueron de 0.41 ± 0.25, 0.72 ± 0.37, 0.51 ± 0.29 y 0.47 ± 0.26, respectivamente; mostrando una reducción significativa ($P \leq 0.05$) de la peroxidación lipídica del semen suplementado con 10% y 20% de plasma seminal, respecto al semen no suplementado (0%).

Tabla 1. Coeficientes de regresión para la producción de EROs en el semen.

TRATAMIENTO	β0 (tiempo)	β 1 (edad)	β 2 (movilidad)	r2
Fresco	0.006	0.02	-0.16	0.82
Plasma 0%	0.006	0.16	-0.33	0.64
Plasma 10%	0.008	0.01	-0.58	0.84
Plasma 20%	0.01	-0.03	-0.46	0.85

Los coeficientes de correlación hallados entre la peroxidación lipídica y la producción de EROs, la movilidad, la vitalidad y la integridad de membrana fueron de 0.35, -0.3, -0.28 y -0.21, respectivamente. Mientras se hallaron coeficientes de regresión entre la producción de EROs y la movilidad, la vitalidad y la integridad de membrana de -0.32, -0.34 y -0.3, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el plasma seminal incrementa la producción de EROs cuando se suplementa en un 10% y un 20%. Los coeficientes de regresión para la producción de EROs, mostraron como tendencia general un incremento en las EROs por efecto del tiempo y de la mayor edad del equino; así como la reducción de las EROs a causa del aumento en la movilidad progresiva del semen. Ball et al. (2001), demostraron el incremen-

to en la generación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en el semen equino en el tiempo. La peroxidación de los lípidos de los espermatozoides después de la criopreservación, desencadena alteraciones a nivel de las membranas: plasmática, acrosomal, mitocondrial y de la vaina del axonema, provocando una reducción en su fluidez e integridad (Baumber et al., 2000; Isachenko V. et al., 2004). La adición de plasma seminal al 10% y 20% permitió controlar los procesos de peroxidación lipídica en el semen equino criopreservado, en niveles equivalentes a la peroxidación del semen fresco. Este efecto podría atribuirse a la presencia de moléculas con función antioxidante en el plasma seminal. Las técnicas estándar de criopreservación producen un descenso en las actividades de glutatión-peroxidasa (GPx), superoxido-dismutasa (SOD) y catalasa (Bustamante et al., 2009). Las correlaciones calculadas muestran una asociación positiva entre la producción de EROs y la peroxidación lipídica, así como una asociación negativa entre la producción de EROs y la peroxidación, con los diferentes parámetros de fertilidad potencial evaluados. Lo cual es indicador del efecto contraproducente de las ERO sobre la integridad y la funcionalidad de las células espermáticas.

CONCLUSIONES

Se concluye que la suplementación del diluyente para la criopreservación de semen equino con plasma seminal, incrementa la producción post-descongelación de EROs, sin embargo dicha suplementación reduce la peroxidación lipídica del semen equino criopreservado.

REFERENCIAS

Ball, B., 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. AnimReprod Sci. 107, 257-267.

Ball B, Vo A., 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. J. Androl. 22(6), 1061-1069.

Ball B, Vo A, Baumber J., 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. Am J Vet Res. 62(4), 508-515.

Baumber J, Ball B., 2005. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. Am J Vet Res. 66, 1415-1419.

Baumber J, Ball B, Gravance C, Medina V, Davies M,. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. J Androl. 21, 895-902.

Bustamante I, Pederzolli C, Sgaravatti A, Gregory R, Dutra C, Jobim M et al., 2009. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. AnimReprod. 6(2), 392-399.

Chenier T, Merkies K, Leibo S, Plante C, Johnson W., 1998. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. AAEP Proceedings.44, 5-6.

Devireddy R, Swanlund D, Olin T, Vincente W, Troedsson M, Bischof J et al., 2002. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. BiolReprod. 66, 222-231.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Montag M, Dessole S, Nawroth F., 2004. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. BiolReprod. 71, 1167-1173.

Mantovani R, Rota A, Falomo M, Bailoni L, Vincenti L., 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. ReprodNutr Dev. 42, 217-226.

Membrillo A, Córdova A, Hicks J, Olivares-Corichi I, Martínez V, Valencia J., 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. INCI. 28(12), 699-704.

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOULA

Evaluación de la eficiencia reproductiva de padrillos de raza Criolla

Reproductive efficiency of Criollo breed stallions

Schmitt FL[1]; Severo GM[2]; Antunes TE[3]; Centena LC[4]; Nobre GO[5]

[1]Médico Veterinário Autônomo; kikols@ig.com.br, (51)92421338; [2]Acadêmico em Medicina Veterinária- FV/UFPel; gilberto.severo@hotmail.com*, (53)99478233; [3]Acadêmica em Medicina Veterinária- FV/UFPel;* escobar_219@hotmail.com,(53)81211831*; [4]Acadêmico em Medicina Veterinária- FV/ULBRA,* lucianocentena@terra.com.br,(51)96939544*; [5]Médico Veterinário Autônomo;goliveiranobre@hotmail.com. (53)99581044*

RESUME

The Criollo breed goes through a period of great economic value, presenting a greater need for the use of reproductive techniques, seeking improvements in the rate of fertility and prolificacy. Recently, new techniques are being used for handling semen to improve the reproductive performance of stallions such as cooling and freezing of semen. This study aims to evaluate the pregnancy rate and utilization of estrous cycles in mares inseminated with cooled semen of stallions with varying fertility rates.

INTRODUÇÃO

O eqüino é a espécie animal que mais gera empregos no cenário mundial, pela tecnificação de sua criação e pelo alto valor agregado de seus produtos. O sistema reprodutivo desses animais apresenta algumas peculiaridades como baixo índice de fertilidade e prolificidade. Os problemas de infertilidade são muitas vezes atribuídos às fêmeas, não sendo realizada uma avaliação criteriosa do macho (PIMENTEL, 1989; HAMES *et al*., 1996). A raça Crioula está em expansão e as biotecnologias como resfriamento e congelamento de sêmen estão sendo usadas para melhorar o desempenho reprodutivo. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a taxa de prenhez e aproveitamento dos ciclos estrais de éguas inseminadas com sêmen resfriado de garanhões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado na cidade de Camaquã, Rio Grande do Sul, Brasil, durante a temporada reprodutiva de outubro de 2011 à março de 2012, com o objetivo de avaliar o índice de prenhez em éguas da raça Crioula inseminadas com sêmen resfriado a 15C° de garanhões com diferentes qualidades de ejaculados. Foram utilizadas 299 éguas, 92 éguas primíparas e 207 éguas multíparas, com idades entre 6 e 18 anos e todas aptas a reprodução, sendo 161

éguas no grupo 1 e 138 no grupo 2, avaliadas por palpação retal e ultrassonografia, sendo inseminadas o mais próximo da ovulação. Foram utilizados 4 garanhões da raça crioula com idade entre 10 e 17 anos, sendo divididos em dois grupos. O grupo 1 (n=2) a média dos ejaculados dos garanhões foi de 40mL sem gel em cada ejaculado, motilidade média de 50%, vigor 3 e concentração de $180X10^6$ espermatozóides/mL e grupo 2 (n=2) com 100mL em cada ejaculado, motilidade média de 30%, vigor 2 e concentração de $120X10^6$ espermatozóides/mL. A avaliação da motilidade e do vigor do ejaculado foi observada em lâmina pré aquecida, observando em microscopia óptica em objetiva de 40. A concentração do ejaculado foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. O método de coleta de sêmen foi através de vagina artificial modelo Botucatu. As coletas eram realizadas uma vez ao dia, 3 dias por semana. Após a coleta o ejaculado foi filtrado e diluído com diluente Botu Sêmen na diluição de $50x10^6$ espermatozóides/ml. O sêmen foi armazenado em caixa Botu Flex à uma temperatura de 15°C, sendo as éguas inseminadas 6 a 12 horas depois. Foi realizada análise estatística de Qui Quadrado e Regressão Logística para estatística dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os índices reprodutivos verificados neste estudo foram propostos para avaliar a eficiência de garanhões ao término de uma estação de monta. Porém, expressa a interação de vários fatores inerentes a fertilidade intrínseca tanto do macho quanto da fêmea e o manejo adotado. As análises morfológicas do ejaculado não devem ser dispensadas, para complementar a avaliação da qualidade espermática e a especificidade do exame, segundo Voss et al 1981 & Pickett ETA al 1989, que concluíram ser a motilidade a melhor característica seminal para estimar a fertilidade potencial do garanhão**.** Houve diferença estatística entre os grupos, sendo o valor de p=0,0003 (p<0,001), contudo, os garanhões avaliados apresentaram o seguinte desempenho, o grupo 1 apresentou 93,16% de prenhez, já o grupo 2, 77,53% de prenhez, demonstrado na tabela 2, enquanto que a tabela 3 demonstra a relação de éguas prenhes por ciclo de cada grupo. Do total de 42 éguas que foram cobertas e permaneceram vazias, 7,4% pertenciam ao grupo 1, e 21,73% ao grupo 2, demonstrado na tabela 1.

Tabela 1- Relação entre grupos de garanhões e éguas vazias

Grupo	n	Éguas vazias	Percentual
1	161	12	7,4%
2	138	30	21,73%
Total	299	42	

Tabela 2- Relação da Taxa de éguas prenhes de cada grupo

Grupo	n	Taxa de Prenhez	%
1	161	150/161	93,16%
2	138	107/138	77,53%
Total	299		

Tabela 3- Relação da taxa de éguas prenhes de cada grupo por ciclo

Grupo	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo	4° ciclo
1	70,66%	18%	8,67%	2,67%
2	55,15%	30,84%	11,21%	2,8%

A qualidade do ejaculado teve relação direta com a taxa de prenhez. Garanhões com motilidade acima de 50% e concentração de $180x10^6$ espermatozóides/mL demonstraram-se eficientes durante a temporada reprodutiva, apresentando uma maior taxa de prenhez das éguas, mesmo sem avaliação qualitativa dos aspectos morfológicos do ejaculado, concordando com a avaliação de Pimentel 1989. A prenhez dá uma ideia global da eficiência dos garanhões, já a prenhez por ciclo possibilitou uma avaliação direta da estimativa da fertilidade, sendo que o grupo 1 apresentou maior taxa de prenhez no primeiro ciclo, enquanto que o grupo 2 apresentou a maior taxa no segundo ciclo, demonstrado na tabela 3.

CONCLUSÃO

A qualidade do ejaculado apresentou relação direta com os índices de prenhez. Ejaculados com motilidade de 50%, vigor 3 e concentração $180x10^6$ espermatozóides/mL mostrou-se eficiente para atingir níveis de prenhez satisfatórios durante a temporada. As análises morfológicas do ejaculado não devem ser dispensadas, para complementar a avaliação da qualidade espermática e a especificidade do exame. A raça crioula apresenta-se em expansão e as avaliações dos reprodutores permitem aumentar a eficiência reprodutiva, sendo as técnicas de biotecnologia de sêmen uma ferramenta importante para a melhoria dos índices.

REFERÊNCIAS

Pimentel, C.A. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte : CBRA, 1989. V.8, p.127-132.

Voss, J.L., Pickett, B.W., Squires, E.L. Stallion spermatozoa morphology and motility and their relationship to fertility. J Amer Vet Med Assoc, v.199, n.12, p.1760-1761, 1981.

Pickett, B.W. Amann, R.P. Mckinnon, A.O. *et al*. Manegement of the stallion for maximum reproductive efficiency, II. Fort Collins : Anim Reprod Laborat, CO., 1989. 126p.

Hammes, A.M., Pimentel, C.A., Fernandes, C.E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. Ciência Rural, v.26, n.2., p.277-283, 1996.

TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOULA. DADOS PRELIMINARES

Tasa de recuperacion embrionaria en yeguas de raza criolla. Resultados preliminares

Embryo recovery rates in Crioulo breed mares. Preliminary data

Gularte Sarmento L[1]; Araujo Lins L[2]; Lança Schmitt F[3]

[1]Acadêmica em medicina veterinária, URCAMP-Bagé 05399797992; luisasarmento_bg@hotmail.com*; rua Gomes Carneiro,1785, Bagé, RS-Brasil. CEP 96400-130; [2]Professora MsC. Faculdade de Veterinária, URCAMP-Bagé. Estrada Passo do Peres, s/ nº, Bagé, RS-Brasil. CEP 96400-000; [3]Médico Veterinário MsC, rua Ivan Iglesia, 80, apto 201, Porto Alegre, RS-Brasil. CEP 91210-340.*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la tasa de recuperación embrionaria en yeguas de raza Criolla, considerando factores de relevancia que afectan significativamente la técnica reproductiva. Para esto, se consideraron 102 lavajes en las temporadas reproductivas 2011-2012 y 2012-2013. Se obtuvieron en total 58 lavajes positivos y 45 negativos. A través de este estudio se pudo constatar que la edad es un factor que influencia de forma negativa la tasa de recuperación embrionaria confirmando que en la raza criolla este factor no se diferencia de los resultados en otras razas.

RESUME

The aim of the present study is to evaluate the embryo recovery rates in Crioulo breed mares, considering the relevant factors that significantly affect the reproductive technique. To do so, we considered 102 flushings during the 2011-2012 and 2012-2013 breeding season. We had a total of 58 positive flushed and 45 negative flushed. Through this study we conclude that the age is a negative factor on the embryo recovery rates, confirming that the Crioulo breed does not differ from other horse breeds in other studies.

INTRODUÇÃO

A raça Crioula vem crescendo a cada dia no Brasil e apresentando altos valores no investimento em biotecnologias. A recente abertura para Transferência de Embriões (TE) e o pouco estudo até hoje empregado na raça justificam a escolha do tema a ser estudado. A TE é uma ferramenta reprodutiva usada em programas de melhoramento genético, a qual proporciona que éguas que não levam a gestação a termo se reproduzam, além de permitir que uma égua de genética superior obtenha potros de pais diferentes em uma mesma temporada. Segundo Gomes (2008), fatores como o dia da coleta, número de ovulações, idade

da doadora, condição uterina desta, nutrição, sanidade, qualidade do sêmen, habilidade técnica e variação climática podem exercem influência negativa sobre a taxa de recuperação embrionária. O artigo tem como objetivo avaliar a taxa de recuperação embrionária em éguas da raça Crioula, submetidas a um programa de TE.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foram consideradas as temporadas reprodutivas de 2011-2012 e 2012-2013 em quinze criatórios de cavalos crioulos no estado do Rio grande do Sul e Paraná. As avaliações necessárias para coleta de dados foram realizadas em um total de 102 lavados, sendo estes realizados por três distintos médicos veterinários especializados na técnica. As éguas utilizadas como doadoras tinham idade variando de três a vinte e cinco anos, media de peso de 420 kg e não havia éguas no cio do potro. Estas se encontravam em manejo extensivo e foram acasaladas por monta natural, inseminação com sêmen fresco e refrigerado de garanhões com fertilidade conhecida, sendo estes de fertilidade alta ou média. As lavagens para coleta de embrião eram realizadas nos dias sete, oito e nove após a detecção da ovulação, sendo a data de lavagem de cada égua eleita de acordo com a idade da mesma, a técnica utilizada para efetuar as lavagens foi com sistema fechado. Seguinte a efetuação da técnica de coleta os embriões eram inovulados nas receptoras antecipadamente selecionadas. Para a análise estatística, foi utilizado o Método de Tukey para avaliar a diferença entre médias da idade das éguas em relação a taxa de recuperação embrionária. Para a correlação entre o dia da coleta e a taxa de recuperação, foi utilizado o método de correlação de Pearson. Ambas as análises foram realizadas com auxílio do Software Statistix® 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada a taxa de recuperação embrionária em éguas Crioulas submetidas a um programa de TE. Foi verificado percentual de 58% de recuperação embrionária, sendo um percentual semelhante a outras raças, como foi reportado por Jacob et al. (2002), o qual apresentou um índice de 63,4% de recuperação em éguas Mangalarga Marchador. Outros relatos de programas comerciais também revelam percentuais de recuperação embrionária similar ou inferiores a este estudo (FLEURY et al., 1989; FLEURY e ALVARENGA, 1999). Neste estudo, foi verificado que a idade da doadora reduz de forma significativa a taxa de recuperação embrionária. A média de idade apresentada pelas éguas que demonstraram lavados positivos foi de 14.9±1.09, sendo de 11.9±0.88 para as que apresentaram lavados negativo ($p = 0.01$). A idade da doadora é um dos fatores que afetam a taxa de recuperação embrionária (Losinno & Alvarenga, 2006). Seguem Squires et. al. (1999) éguas velhas apresentam baixa fertilidade e quando em programas de TE, os índices de recuperação embrionária também são baixos. Para Losinno & Alvarenga (2006) de fato, a reduzida taxa de recuperação embrionária verificada em éguas velhas se encontra relacionada com a qualidade do ovócito, ou seja, a eficiência reprodutiva torna-se significativamente menor, com distúrbios da ovulação e maturação ovocitária. O dia de coleta não foi estatisticamente significativo com relação a taxa de recuperação embrionária nas éguas avaliadas ($P > 0.4$). Como o demonstrado por Fleury e Alvarenga (1999) em um estudo que analisou de um programa comercial de T.E no Brasil, não houve significativa diferença na recuperação embrionária nos dias sete, oito e nove pos-ovulação. Iuliano et al. (1985) obtiveram taxa de recuperação embrionária menor no dia seis pos-ovulação do que no dia oito. Segundo Squires et al. (1999), o desenvolvimento embrionário e o transporte pelo oviduto de éguas velhas pode ser retardado, sendo assim as coletas no dia oito e nove mais apropriadas para estas éguas.

CONCLUSÃO

Por meio desse estudo pode-se verificar um dos fatores que influenciam a taxa de recuperação embrionária de eqüinos, confirmando-se que não existe diferença da raça Crioula para as outras até então estudadas com este propósito.

REFERÊNCIAS

Fleury, J.J; Costa Neto, J.B.F.; Alvarenga, M.A. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares im Brazil. Equine Vet. J. Suppl., v.8, p. 73-74, 1989.

Fleury, J.J.; Alvarenga, M.A. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. Theriog., v.51, p.261, 1999.

Gomes, M. G.; Gomes, L. P. M. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. Acta Sci. Vet., v.36 (supl.2), n. 1, p. 199-206, 2008.

Iuliano, M.F.; Squires, E.L.; Cook, U.M. Effect of age of embryo and mmethod of transfer on pregnancy rate. Journal of Animal Science, v.60, n.1, p. 258-263, 1985.

Jacob, J.C.F.; Domingues, I.B.; Gastal, E.L. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. Theriog., v.57, n.1, p.545, 2002.

Losinno L, Alvarenga M. Factores críticos del manejo embrionario en programas de transferencia embrionaria en equinos. Proceedings del I Congresso Argentino de Reproducción Equina, 89-94, 2006.

Squires, E.L.; Mccue, P.M.; Vanderwall, D. The current status of equine embryo transfer. Theriog., v.51, p. 91-104, 1999.

HIPERESTIMULACION FOLICULAR Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO EN YEGUAS OVULATORIAS Y ANOVULATORIAS UTILIZANDO FSH EQUINA RECOMBINANTE

[1]Losinno L; [2]Miragaya MH; [3]Mutto A; [4]Bereterbide S; [4]MacDonoughJ; [1]Pietrani M; [5] Colgin M; [6]Ross PJ

[1]Laboratorio de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Rio Cuarto; [2]Facultad de Cs Veterinarias, Universidad de Buenos Aires; [3]Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de Gral. San Martin; [4]La Irenita Embriones; [5]Aspen BioPharmaInc, CO, USA; [6]Dpt of Animal Science, University of California Davis, CA, USA. llosinno@gmail.com

RESUME

One of the major constraints in the efficiency of commercial embryo transfer programs in horses is the lack of effective and consistent follicular stimulation protocols ("superovulation"). The aim of this study was to evaluate the response in terms of production of transferable embryos and pregnancy rates, to a follicular stimulation treatment with recombinant equine FSH, using the same dose and protocol, in anovulatory and ovulatory mares. Seasonally anovulatory mares (Group 1, n=10) were treated with two daily IM applications (AM/PM) of 0.65 mg reFSH (AspenBioPharma, CO). Treatment was ended when at least one follicle ≥ 35 mm was observed and 24-36 hours later 2500 IU of hCG were administered. Mares were inseminated with fresh or frozen semen from stallions of proven fertility. Ovulations were monitored every 12 hours. Control Anovulatory group were treated with saline using the same protocol. No supplementary light and/or nutritional support were used. Ovulatory group (Group 3, n = 10) were given two daily IM applications (AM/PM) of 0.65 mg reFSH (AspenBioPharma, CO) for 3 days after detection of > 20 and <25 mm follicles (day 0).Then, once a day until the detection of at least one ≥ 35 mm follicle. Ovulation was induced with deslorelin LA (1 mg, IM) (BET Pharm, Lex, Ky, USA). All mares received cloprostenol sodium 500ug on day 2 of treatment. Inseminations were performed with fresh semen every 48 hours until the detection of the last ovulation. Control records for ovulatory mares were taken from the average historical production of embryos from the same treated mares. In the positive response mares, standard embryo recovery procedure was performed eight days after the first ovulation and embryos were transferred into synchronized recipients. Pregnancy was evaluated by ultrasound at 7,14 and 21 days post-transfer. Statistical analysis was performed by ANOVA (ST: Station / vsreFSH), and their interaction as main effects and t test.In treated anovulatory mares positive response rate (development of more than one preovulatory follicle) was 80% with an average of 5.9 treatment days. In mares with positive response (8/10), on average, 5.1 ovulations weredetected, 1.9 embryos recovered and a 57% pregnancy rate achieved after embryo transfer. No follicular development and ovulation were detected in anovulatory control mares. In treated ovulatory mares, positive response was 80%. In mares that responded, the average number of preovulatory follicles was 5.2, 4.6 ovulation rate per mare, 2.7 embryos recovered and 72% pregnancy rate. Comparison of the results of this experiment with historical records from five previous seasons of the same mares (128 flushings) indicated that, on average, the number of embryos recovered by flushing was more than twice on reFSH treatment group (1.63 vs. 0.69) while the pregnancy rates were not different (70% vs 60%, respectively).

INTRODUCCION

Una de las mayores limitantes en la eficiencia en programas comerciales de transferencias embrionarias (TE) en equinos es -hasta el momento-, la imposibilidad de contar con protocolos de estimulacion folicular ("superovulacion") eficaces y consistentes. El objetivo final es el de producir múltiples embriones viables por ciclo, incrementando la eficiencia del proceso. En los últimos años se han ensayado diversos protocolos utilizando gonadotrofinas equina, porcina, humana, extractos de pituitaria, antagonistas de inhibina, etc. sin lograr resultados consistentes y económicamente aceptables (Squires y McCue, 2006). Recientemente, el uso de FSH recombinante equina (reFSHe) ha demostrado ser eficaz en inducir superovulación y múltiple producción *in vivo*de embriones en yeguas en estación reproductiva y anovulatorias (Meyers Brown *et al* 2010; Roser *et al* 2012; Ross *et al*, 2012). El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta en términos de producción de embriones transferibles y tasas de preñez, a un tratamiento de estimulación folicular con FSH recombinante equina, utilizando la misma dosis y protocolo, en yeguas ovulatorias y anovulatorias.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el área central de Argentina (33°de latitud Sur) durante la temporada invernal de 2011 (julio), para el grupo de yeguas anovulatorias y estival de 2012 (enero) para el grupo de yeguas ovulatorias. Para el grupo tratamiento de anovulatorias (Grupo 1; n=10), se utilizaron 5yeguas de raza Polo Argentino con edades entre 4 y 14 años y 5 yeguas de salto, todas donantes de embriones con antecedentes de fertilidad aceptable.Para el grupo control anovulatorias (Grupo 2; n=10) se utilizaron yeguas mestizas (receptoras de embriones) de fertilidad probada. El criterio de inclusión para todo el grupo de yeguas anovulatorias fue la ausencia ecográfica de un CL y folículos <5mm. Ninguna de las yeguas recibió terapia lumínica ni suplementos alimenticios. Todas se encontraban pastoreando verdeo de centeno *ad libitum* y con un score corporal 7-8/9.Para el grupo tratamiento de yeguas ovulatorias (Grupo 3; n=10) se utilizaron yeguas de raza Polo Argentino donantes de embriones con edades entre 5 y 14 años y de fertilidad probada. El criterio de inclusión fue la presencia ecográfica de un CL y los antecedentes de actividad cíclica regular en el periodo inmediato anterior al comienzo del experimento.Para la transferencia de los embriones recuperados, en todos los grupos se utilizaron receptoras seleccionadas en base al examen ginecológico y datos de fertilidad. En el caso de las utilizadas como receptoras de embriones del grupo 1 (anovulatorias), fueron tratadas previamente con progesterona exógena de larga acción(Squires y McCue, 2011).Protocolos de tratamientos: para el grupo1 (anovulatorias), el tratamiento consistió en 2 aplicaciones diarias (AM y PM) por vía IM, de 0.65 mg reFSH (AspenBioPharma, CO) hasta la constatación de al menos un folículo ≥ 35 mm, cuando el tratamiento fue suspendido y 24-36 hs después se administraron 2500 UI de hCG EV y fueron inseminadas con semen fresco o congelado de padrillos de fertilidad probada. La/s ovulaciones fueron monitoreadas ecográficamente cada 12 hs. Para el grupo 2 (Control, anovulatorias), las yeguas fueron tratadas con solución fisiológica estéril IM con el mismo esquema y cronograma que las del grupo 1. Para las yeguas ovulatorias (grupo 3; n=10), luego de detectar una ovulación ecográficamente, las yeguas se evaluaron diariamente hasta la detección del reclutamiento y presencia de folículos>20 y <25 mm (día 0). A partir de allí, se les administraron 2 aplicaciones diarias (AM y PM) por vía IM de0,65 mg de reFSH (AspenBioPharma, CO) durante 3 días y luego una vez por día hasta la detección de al menos un folículo ≥ 35 mm.La ovulación fue inducida con Deslorelina LA (1mg, IM) (BET Pharm, Lex, Ky, USA). Todas las yeguas recibieron 500ug de cloprostenol sódico el día 2 del tratamiento. Las inseminaciones fueron realizadas con

semen fresco a partir de la aplicación de deslorelina y cada 48 hs hasta la detección de la última ovulación. Los controles de las yeguas ovulatorias fueron tomados de la producción histórica promedio de embriones de las mismas yeguas tratadas. En los dos grupos (1 y 2), ocho días después de la primer ovulación, se realizó la recuperación estándar de embriones por vía transcervical y los embriones recuperados fueron transferidos en receptoras sincronizadas que fueron evaluadas por preñez ecográficamente a los días 7,14 y 21 post--transferencia.El análisis estadístico se realizó por ANOVA (ST: estación/vs reFSH), y su interacción como los efectos principales y t test.

RESULTADOS

Los resultados para cada grupo se presentan en las tablas 1 (anovulatorias) y 2 (ovulatorias).

Tabla 1. Resultados de la respuesta a un ciclo de tratamiento con rFSH versus PBS en yeguas anovulatorias

Grupo ANOV	n	Días de tratamiento (promedio)	Respuesta positiva	Folículos >35 mm (promedio)	Ovulaciones por yegua (promedio)	Embriones recuperados por yegua ovulada (promedio)	Embriones transferidos	Tasa de preñez (%)
1 (rFSH)	10	5,9±0.6a	8/10	5,2±0,9a	5,1±1,0	1,9±0,5	14	57
2 (PBS)	10	10±0b	0/10	0±0b	0	0	0	-

Los valores (significancia ± S.E.M) en una columna con diferentes superíndices son diferencias significativas (P < 0,05).

Tabla 2. Resultados de un ciclo de tratamiento con rFSH en yeguas ovulatorias

Grupo OV	n	Días de tratamiento (promedio)	Respuesta positiva	Folículos >35 mm (promedio)	Ovulaciones por yegua (promedio)	Embriones recuperados por yegua ovulada (promedio)	Embriones transferidos	Tasa de preñez (%)
3 (reFSH)	10	7	8/10	5,2	4,6	2,7	22	72

En el grupo de yeguas anovulatorias tratadas con reFSH la tasa de respuesta positiva (desarrollo de más de un folículo preovulatorio) fue de 80% con un promedio de 5,9 días de tratamiento. En las yeguas que respondieron (8/10), en promedio, la tasa de ovulaciones detectadas fue de 5,1, el número de embriones recuperados por yegua de 1,9 y la tasa de preñez a receptoras anovulatorias tratadas con progesterona de 57%. No fue detectado desarrollo folicular ni ovulaciones en las yeguas anovulatorias del grupo control tratadas con solución fisiológica.En el grupo de yeguas ovulatorias tratadas con reFSH, la respuesta positiva fue de 80%. En las yeguas que respondieron, en promedio el número de folículos preovulatorios fue de 5,2, la tasa de ovulación por yegua de 4,6, se recuperaron 2,7 embriones y la tasa de preñez final fue de 72%. Una de las yeguas desarrollo folículos hemorrági-

cos anovulatorios. La comparación de los resultados de este experimento con los registros históricos de 5 temporadas anteriores de las mismas yeguas (128 lavajes) indican que, en promedio, el número de embriones recuperados por lavaje es más del doble con el tratamiento hiperstimulatorio (1,63 vs 0,69) aunque las tasas de preñez no fueron diferentes (70% vs 60%, respectivamente).

DISCUSION

La hiperestimulacion folicular en la yegua utilizando gonadotrofinas hipofisarias naturales extraídas de cadáveres, homologas o heterólogas, con grandes variaciones en la relación FSH:LH han demostrado inconsistencia en los resultados y por lo tanto una baja predictibilidad en programas comerciales, lo que ha limitado o directamente excluido su utilización en el mercado. El desarrollo de gonadotrofinas recombinantes ha demostrado su actividad en humanos, primates, roedores y bovinos (Tharasanit et al, 2006) y los resultados obtenidos en nuestros trabajos preliminares con reFSH equina, son coincidentes con los de otros grupos de investigadores independientes en demostrar la eficacia clínica de la misma. Sin embargo aun son necesarios más estudios en sistemas reales para determinar su consistencia y confiabilidad.De todos modos, las ventajas de las gonadotrofinas recombinantes y sus potenciales aplicaciones en el campo de la reproducción equina han sido claramente expuestas recientemente por Roser et al (2012): 1) Inducir superovulacion para incrementar el número de embriones en programas de TE; 2) Incrementar el número de ovocitos disponibles por ciclo en programas de OPU-GIFT/ OPUICSI; 3 inducir actividad folicular en yeguas en estado anovulatorio post parto o estacional; 4) inducir actividad folicular en yeguas viejas anovulatorias; 5) adelantar la primera ovulación del año en yeguas transicionales.

Nuestros resultados muestran que, términos generales, las tasas de respuesta positiva fueron similares entre ambos grupos en estados fisiológicos muy diferentes y frente al mismo protocolo de estimulación. Sin embargo, las diferencias en los resultados de preñez post transferencia pueden ser debidas al estado y disponibilidad de receptoras utilizadas en el invierno, bajo tratamientos hormonales, una situación muy diferente a la temporada reproductiva.

CONCLUSIONES

En las condiciones experimentales descriptas, en estudios controlados, bajo programas comerciales de producción de embriones equinos, los resultados obtenidos demuestran que es posible obtener una producción de embriones transferibles, con tasas de fertilidad aceptable en yeguas en periodo anovulatorio estacional. En general esta es una fase improductiva desde el punto de vista reproductivo, especialmente en yeguas deportivas en campaña activa, y una herramienta biotecnológica como una gonadotrofina recombinante asociada a una técnica de reproducción asistida como la transferencia embrionaria permitiría incrementar la eficiencia productiva. En yeguas donantes ovulatorias los resultados muestran que es posible incrementar las tasas de producción de embriones y preñeces por ciclo de tratamientos acortando los periodos de trabajo e incrementando la eficiencia global por donante.

REFERENCIAS

Ross PJ; MacDonough J; Bereterbide S; Garzaron A; Balbuena G; Pietrani M; Miragaya MH; Mutto A; Colgin M; Losinno L. Superovulation of cycling donor mares using recombinanteequine gonadotropins and different ovulation induction agents. 8th ISEET Abstracts/Journal of EquineVeterinaryScience (2012) 32: 403.

Ross PJ; Etcharren MV; Miragaya MH; Mutto A; Colgin M; Losinno L. Superovulation and embryo recovery in seasonally anovulatory mares treated with recombinantequine FSH. ReproductiononDomesticAnimals (2012)

Roser JF; Meyers-Brown MS. Superovulation in the mare: a work in progress. Journal of EquineVeterinaryScience (2012)32:376-386

Meyers-Brown GA; McCue PM; Niswender KD; Squires EL; DeLuca CA; Bidstrup LA et al. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH); ovulation rates, embryo retrieval and hormone profiles. Journal of EquineVeterinaryScience (2010) 30: 560-568.

Squires. E. L.; McCue P. M. Superovulation. In: McKinnon A. O.; Squires E. L.; Vaala W. E.; Varner D. D. Equine Reproduction (2011)1836-1844. Wiley-Blackwell, 2ndEdition.

Tharasanit T; Colembrander B; Bevers MM; Stout TA. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. Theriogenology (2006) 65: 1071-1081.

Roser J; Troedsson M; McCue P; Meyers-BrownG; Klein C; Zent W; Ferris R; Lindholm A; Scofield D; Claes A; Morganti M; Colgin M; Wetzel R; Peters A. Induction of ovulation in seasonally anestrous mares using recombinant equine follicle-stimulating hormone. Proc. AAEP (2011) 57: 231-232

Transferencia embrionaria # 36

EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL INTERVALO INTEROVULATORIO Y FRECUENCIA DE ENDOMETRITIS EN YEGUAS DONANTES DE EMBRIONES DE RAZA SILLA ARGENTINO

Age effect on interovulatory interval and endometritis frequency on Silla Argentino breed donor mares

Marinone, AI [12]***; Fumuso, E*** [1]***; Bruno, S*** [3]***; Brust, A*** [3]***; Herrera, M*** [12]***; Redolatti, C*** [14]***; Losinno, L*** [5]

[1]*Laboratorio de Clínica y Reproducción Equina, Facultad de Ciencias Veterinarias Tandil-Argentina;* [2]*Becaria CONICET;* [3]*Haras General Lavalle, Tandil- Argentina;* [4]*Becaria CIC;* [5]*Laboratorio de Producción Equina, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto- Argentina.*

RESUME

The aim of this work was to validate the experimental design and statistical model to study the impact of age on reproductive parameters in Silla Argentino embryo donor mares. Two variables previously validated by other researchers were studied in young and old mares: endometritis frequency and inteorvulatory intervals (IIO) length. Data was collected during two breeding seasons on an equine embryo production program. A total of 202 uterine effluents (104 from old and 98 from young mares) and 162 IIO (92 from old and 75 from young mares) were studied. Exfoliative cytology and bacterial culture were taken from uterine effluents. Statistical analysis showed differences in the percentage of positives cultures (p=0.0350) and positives cytologies. Both were higher in old mares. No statistical difference were found in length of IIO (p>0.05). On simple regression model an age effect was established for the slope of the line of old mares (P=0,02), no detected in the IIO of young mares (P=0,90). Results from this work suggest that aged Silla Argentino donor mares increased endometritris frequency and interovulatory intervals in continuous embryo production programs. Also, the experimental design and statistical model are useful to analyze the proposed variables.

INTRODUCCION

En la yegua la disminución en los índices de fertilidad ocurre a partir de los 15-17 años de edad (Ginther, 1992; Losinno y Aguilar, 2000). El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial que produce, entre muchos otros efectos, cambios endometriales que incrementan, en la yegua, la susceptibilidad a endometritis (Pycock, 2006) y cambios cíclicos que probablemente reflejan alteraciones regulatorias en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Atwood y Bowen, 2011). Las yeguas susceptibles a endometritis presentan un retraso en el "*clearence*" o depuracion uterina de bacterias, fluido y detritus luego del servicio (Nikolakopoulos y Watson, 1999) que puede estar causado por: disminución de la actividad del miometrio, cambios vasculares en el endometrio, respuestas hormonales alteradas (Troedsson, 1999) y alteración en la producción de mucus (Card, 2005). En el marco de la tesis doctoral "*Determinación del estado de desarrollo y viabilidad de embriones equinos en relación a*

la edad de las yeguas donantes", y con el propósito de validar el diseño experimental y modelo estadístico, se evaluó en forma preliminar el efecto de la edad sobre la frecuencia de endometritis y la duración de los intervalos inter-ovulatorios (IIO) en yeguas raza Silla Argentino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrollo en un haras de raza Silla Argentino cercano a Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Durante dos temporadas reproductivas consecutivas para la recuperación de embriones, se trabajó con un total 34 yeguas donantes, 14 viejas (14 a 25 años de edad) y 20 jóvenes (3 y 10 años de edad). Las yeguas fueron revisadas diariamente por palpación rectal y ultrasonografía para determinar el estado del ciclo y fueron inseminadas (IA) con semen fresco con un mínimo de 500 millones de espermatozoides motiles de padrillos jóvenes y fértiles pertenecientes al mismo establecimiento. Luego de la IA, se evaluaron diariamente hasta detectar la ovulación (día de la ovulación= día 0). Se registraron las fechas de la IA y la ovulación para cada yegua en la totalidad de los ciclos evaluados. Para la recolección embrionaria se utilizo un sistema de circuito cerrado 8 días post-ovulación por el mismo operador e inmediatamente se les administró a las donantes 250 ug de Cloprostenol im para producir luteólisis y recomenzar un nuevo ciclo de IA/TE. A partir de la placa de búsqueda embrionaria, se tomaron muestras del efluente en tubos estériles, que fueron centrifugadas a 400 g y el sobrenadante fue descartado. El pellet fue re-suspendido en 1ml de PBCS y agitado mecánicamente para su homogenización. A partir de ésta suspensión, se realizo un cultivo bacteriológico en Agar Sangre y una citología exfoliativa para evaluar la presencia de polimorfonucleares (PMN). Los preparados fueron coloreados con la tinción Color Fast (Biopack®, Argentina). La evaluación se realizó a 1000X de acuerdo al método propuesto por Couto y Hughes 1994. Se analizaron un total de 202 efluentes, de los cuales 104 correspondieron a yeguas viejas y 98 a yeguas jóvenes. Para el análisis estadístico de los resultados de cultivo y citología de cada ciclo, se utilizó el procedimiento PROC GENMOD del SAS V9.3, contemplando una distribución binomial, con la función de ligadura *logit* y las mediciones repetidas fueron modeladas con una estructura de covariancias de simetría compuesta. Los intervalos interovulatorios (IIO) para cada categoría (jóvenes y viejas) se calcularon comparando la duración de los mismos (en días) entre ambos grupos etarios, contabilizando en total 92 IIO de yeguas viejas y 75 de yeguas jóvenes. Para el análisis estadístico de los IIO, se promedió la duración en días de los distintos intervalos de cada yegua. La comparación de los promedios y las variancias de cada grupo (jóvenes y viejas) fue realizada mediante un test t con el procedimiento PROC TTEST de SAS V9.3. (SAS Institute, Cary, IN, USA). Posteriormente se realizó un ajuste de regresión utilizando el procedimiento PROC REG del SAS V9.3.

RESULTADOS

En el análisis de los efluentes se detectaron diferencias estadísticamente significativas tanto el porcentaje de cultivos positivos (p=0.0350) como el de citologías positivas (p=0.0405). Según se muestra en la tabla 1 fueron superiores en las yeguas viejas comparadas con las jóvenes.

Tabla 1: Resultados de cultivos bacteriológicos y citologías de los efluentes de yeguas jóvenes y viejas

Variable	Grupo		Valor p
	Jóvenes	Viejas	
Cultivos +	28/98 (28.5%) a	45/104 (43.3%) b	p=0.0350
Citologías +	13/98 (13.3%) a	26/104 (26.9%) b	p=0.0405

Referencias: (+): positivo, las diferentes letras como superíndice en la misma fila indican diferencias significativas considerándose a las mismas <0.05

En el test t para la duración del ciclo no fueron detectadas diferencias significativas en la duración media (p>0.05), pero fue detectada una mayor variación en el grupo de las yeguas viejas. Posteriormente, en cada grupo fue ajustado un modelo de regresión lineal simple, donde se pudo observar que mientras en el grupo de jóvenes la pendiente no fue significativa (p=0.9006), en el grupo de yeguas viejas la pendiente de la recta estimada fue significativa (p=0.0211).

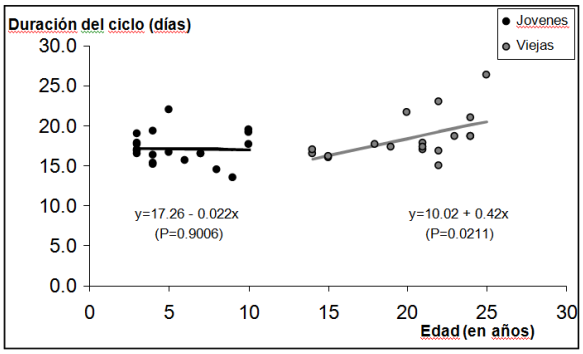


Figura 1: Duración media del ciclo estral en yeguas jóvenes y viejas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de los resultados de dos temporadas bajo el diseño experimental y análisis estadístico utilizado se lograron establecer diferencias significativas entre el grupo de yeguas jóvenes y viejas, en los parámetros estudiados. En particular, la coincidencia de los resultados obtenidos con lo reportado en la bibliografía en cuanto a la susceptibilidad de la yegua vieja a contraer endometritis (Troedsson et al 2001; Pycock, 2006) y el alargamiento de los intervalos interovulatorios (Carnevale et al, 1993, Carnevale et al, 1994; Ginther et al, 2008) permitieron validar el modelo estadístico utilizado. El presente estudio se consolidará con los datos de la tercera temporada actualmente en curso. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos hasta el momento, fue posible determinar que la edad avanzada en yeguas raza Silla Argentino en programas continuos de recuperación embrionaria, afecta la susceptibilidad a la endometritis entre los 14 y 25 años y los intervalos interovulatorios a partir de los 20 años.

REFERENCIAS

Atwood CS; Bowen RL (2011). The reproductive cell-cycle theory of aging: An update. Experimental Gerontology 46 (100-107).

Brinsko SP, Ball BA, Miller PG, Thomas PGA, Ellington JE (1994). In vitro development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. J Reprod Fertil;102:371–378

Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology* **64**: 580-588.

Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ (1993). Aging effects on follicular activity and concentration of FSH, LH and progesterone in mares. Anim Reprod Sci 31:287-99.

Carnevale, E. M., Bergfelt,D. R., and Ginther,O. J. (1994). Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 231–246. doi:10.1016/0378-4320(94)90039-6.

Ginther OJ (1992). Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects. Sec Ed, Equiservices Pub, Madison WI, USA.

Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MAR, Beg MA (2008). Age effects on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. Reprod Fertil Dev 2008;20:955–63.

Nikolakopoulos, E. and Watson, E.D. (1999). Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology* **52**: 413-423.

Pycock JF (2006). How to Maximize the Chances of Breeding Successfully From the Older Maiden Mare. AAEP PROCEEDINGS 2006; 52: 245- 49.

Troedsson, M.H. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* **52**: 461-471.

Troedsson, M.H., Loset, K., Alghamdi, A.M., Dahms, B. and Crabo, B.G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science* **68**: 273-278.

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE TÉCNICAS DE VINCULACIÓN Y APRENDIZAJE NO TRAUMÁTICO APLICADAS A POTRILLOS DE RAZA CRIOLLA, EN CRÍA SEMI EXTENSIVA

Preliminary assessment of non traumatic linking and learning techniques applied to Criollo breed foals in semi extensive breeding

***Paz S*[12]; *Flores M*[1]; *Abbiati N*[1]**

[1]*Facultad de Ciencias Agrarias, UNLZ, Ruta 4 kilómetro 2, Llavallol, Buenos Aires, Argentina*
[2]*Tel: 1554002826* – ingspaz@yahoo.com

RESUME

This work can be considered as preliminary results and to assess the application No traumatic Linking and Learning Techniques (TVANT) for semi-extensive equine operating models. We present results obtained on four of the 16 total variables analyzed, Hoof hitting, Advance, Limbs elevation and Working check-up Passage Area. These maneuvers were performed using a completely randomized design in four treatments in a factorial arrangement 2x2. The experimental units were foals born to field up to 72 hours of life with a sample size of 30 and a control group. In general they allowed a positive learning TVANT shown in a decrease of the switching times.

INTRODUCCIÓN

El sistema de cría equina en Argentina es mayoritariamente bajo sistemas extensivos o semi-extensivos, con partos a campo, teniendo sus primeros vínculos con los operadores entre los 6 a 8 meses de vida (Dowdall, 1982), desaprovechándose el periodo de aprendizaje del animal y retrasando la sociabilización con el humano. Las técnicas de imprinting, ampliamente difundidas en sistemas intensivos como SPC y Polo pueden influir en el comportamiento del caballo adulto y reducir su miedo a los humanos y otras situaciones de distress (Lansade et al., 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar, en forma preliminar, el comportamiento de Técnicas de Vinculación y Aprendizaje no Traumático (TVANT), ajustadas a sistemas de cria semi-extensivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en Estancia La República, Luján, Buenos Aires, Argentina, establecimiento de cría semi-extensiva de caballos de la Raza Criolla, tomándose mediciones al aprendizaje (AP) y al destete (DT).Al AP se empleó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2x2 (utilización de una rutina ordenada de acuerdo a su complejidad, de bloques de maniobras o desordenada; utilización o no de sujeción al palenque). Las unidades experimentales fueron 30 potrillos de 48-72 horas de nacidos a campo. Las rutinas se aplicaron desde el día 7 de iniciado el ensayo hasta el día 21.Al destete (DT), se

trabajó con un conjunto reducido de los animales del inicio, a los que se les continuó ese día por única vez el mismo tratamiento, más testigos de edad similar del mismo establecimiento seleccionados por su facilidad de acercamiento al humano. A estos últimos se les efectuó dos tratamientos: una rutina ordenada de bloques de maniobras de acuerdo a su complejidad o desordenada, siempre con utilización de sujeción al palenque. Para el presente trabajo se analizan 4 de las 16 variables medidas: *Tiempos de Tardanza (en segundos) de Elevación de Miembros* (TEM), de *Casqueo* (TC), de *Avance* (TA) y de *Manga* (TM). Para el análisis estadístico se emplearon Modelos Mixtos (Mc Culloch y Searle, 2001). La parte fija modeló arreglos factoriales con interacción utilizándose, según el modelo, los factores Orden (Ordenado, Aleatorio), Palenque (Con Palenque, Sin Palenque), Testigo (Si, No) y Día (7, 14, 21 y DT).Se recurrió al criterio de información de Akaike para la elección de la estructura de R que modeló la correlación a lo largo del tiempo y/o la heterogeneidad de varianzas. En los análisis de varianza (ANVA) y de comparaciones múltiples de Tukey se trabajó con un nivel de significación del 5%, ajustándose los grados de libertad del denominador por el método de Kenward y Roger. El procesamiento de los datos se realizó mediante de los software SAS (SAS Institute Inc, 2009) e Infostat (Balzarini etal., 2008).

RESULTADOS

En la Tabla 1 figuran estadísticos descriptivos, según tratamiento y día, de las variables para los potrillos tratados entre el inicio y DT. Se observa alta variabilidad en el inicio y en el DT en TEM y TC. Los promedios, en general, tienden a disminuir del inicio al día 21 pero a incrementar en el DT (Figura 1). Salvo en el día 14 para TM y TA donde se produce una gran variabilidad entre los tiempos en general.

Tratamiento		Potrillos	Día	TEM		TC		TM		TA	
				Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Aleatorio	Con Palenque	7	7	249.86	144.19	133.14	104.19	16.29	11.53	35.00	25.24
			14	131.00	60.11	60.00	13.09	10.43	5.80	26.29	3.30
			21	96.14	33.12	71.71	31.90	8.43	1.40	28.29	13.59
			DT	262.00	172.88	151.71	200.24	25.29	27.87	23.29	3.45
Aleatorio	Sin Palenque	7	7	172.86	57.66	198.43	109.90	14.57	9.74	41.43	30.31
			14	95.57	69.24	60.43	22.82	9.71	6.40	54.57	70.90
			21	86.86	34.31	61.43	16.94	7.29	1.60	24.29	3.30
		6	DT	220.83	171.58	166.67	215.66	14.83	4.62	24.17	2.23
Ordenado	Con Palenque	8	7	131.75	49.65	89.88	41.97	15.50	7.87	28.63	11.10
			14	119.88	51.30	63.50	36.98	21.88	33.82	55.25	48.79
			21	86.25	25.56	44.13	15.85	8.14	2.27	29.00	9.36
		5	DT	161.20	75.08	76.00	30.44	16.60	8.11	27.80	10.85
Ordenado	sin Palenque	8	7	141.00	44.20	104.50	33.01	13.88	10.80	30.88	12.32
			14	129.13	39.83	75.13	31.67	23.75	33.36	25.50	3.66
			21	87.50	21.27	46.13	11.01	8.38	1.77	26.50	11.75
		6	DT	175.50	71.54	89.33	46.22	12.67	6.44	24.33	3.27

1. Estadísticos descriptivos según tratamiento y día para TEM, TC, TM y TA.

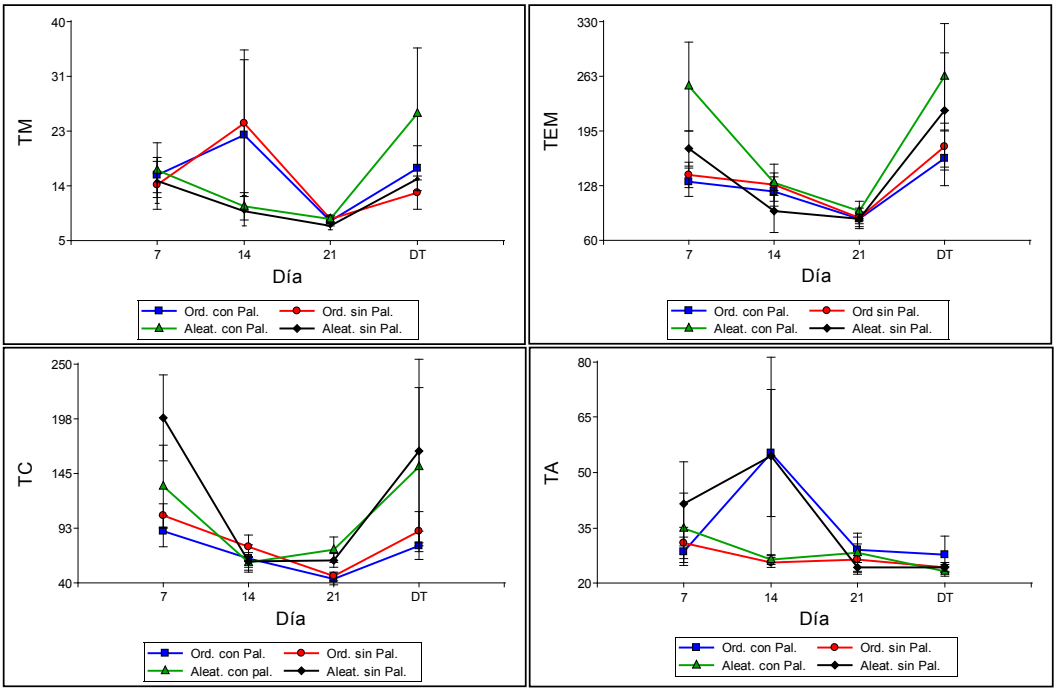


Figura 1.Variables a lo largo de las fechas según tratamientos. Promedios y E.E..

En el ANVA para TEM y TC se detectó diferencias en el Orden (p=0.0238 y p=0.0137, respectivamente), con mayor tardanza en el Aleatorio, y, en el Día (p<0.0001 y p=0.0007, respectivamente), no detectándose diferencias entre los días inicial y DT por un lado, y entre los intermedios por el otro. En TM no hubo diferencias entre tratamientos, pero si entre los días (p=0.0003), siendo el 21 el de menor tardanza. En TA no hubo diferencias entre tratamientos, pero si entre los días (p=0.0434), difiriendo los días inicial y al DT, siendo menor la tardanza al DT. Es de hacer notar que tanto en TM como en TA se presentó una gran variabilidad en los tiempos para el día 14. En al análisis al DT de los potrillos tratados al APy control,puede observarse una gran variabilidad en TEM y TC en todos los casos salvo en aquellos potrillos tratados Ordenados con Palenque. En cambio en TM y TA la mayor variabilidad se presenta en los testigos del tratamiento Aleatorio Con Palenque (Tabla 2).

Tratamiento		Tratado al AP	Potrillos	TEM		TC		TM		TA	
				Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Aleatorio	Con Palenque	Si	7	262.00	172.88	151.71	200.24	25.29	27.87	23.29	3.45
		No	5	369.60	256.31	374.20	309.32	136.20	259.37	139.60	257.38
Ordenado	Con Palenque	Si	5	161.20	75.08	76.00	30.44	16.60	8.11	27.80	10.85
		No	3	292.67	270.10	600.00	0.00	20.67	13.20	19.33	1.53

Tabla 2. Estadísticos descriptivos según tratamiento en potrillos tratados al AP y testigos para TEM, TC, TM y TA al DT.

En el ANVA no se detectó interacción ni diferencias entre tratamientos ni tipo de potrillos (testigos o tratados al AP), (p>0.05), para ninguna de las variables, posiblemente debido a la gran variabilidad existente. En TC no se tuvo en cuenta en el análisis el testigo ordenado con palenque, pues a ninguno de los potrillos pudo realizársele la tarea en el tiempo estipulado como máximo (10').

DISCUSIÓN

King (2002) propone la existencia de un período breve de aprendizaje en el equino, mientras que Miller y Cook (1997) lo cuantifica entre los 45 minutos posteriores al nacimiento, extendiéndose por un período corto, siendo ajustable a sistemas intensivos con partos asistidos. Sin embargo González del Pino (2009) afirma que el aprendizaje, mediante sociabilización temprana, abarca tres a cuatro semanas adaptable a modelos de producción semi intensivos con partos a campo y potrillos de hasta 48hs de nacidos. Los resultados obtenidos confirman la presencia de la ventana de aprendizaje. La reducción de tiempos en AP no se mantiene en DT. Este efecto negativo se podría sustentar en los aspectos: el tiempo transcurrido hasta el DT; el periodo de 21 días podría ser insuficiente para consolidar el aprendizaje.

CONCLUSIONES

En AP, en general, se observa una disminución de los tiempos de maniobra. A excepción de TA, todas las variables incrementan sus tiempos a DT. El tratamiento Ordenado con Palenque posee una disminución de tiempo de maniobra con respecto al Aleatorio con Palenque. A excepción de TA, en el periodo de 21 días hasta DT, los tiempos de maniobra se incrementan alcanzando valores cercanos a los establecidos al inicio del aprendizaje. Al DT hubo una gran variabilidad entre tratamientos que no permite mostrar diferencias entre tratados al AP y los potrillos no tratados dóciles.

AGRADECIMIENTOS: Cabaña La República, Sr. Santiago Tapia, Juan Arioni; María Emilia Dasnoy; Noelia Fernandez Barszczuk, Ezequiel García, Florencia García, Elian Martinez, Alejo Martinez Santamaria, Sabrina Radics, Daniela Refojo, Claudia Reyes, Cristian Rojas, Fiorella Tobioy María Teresa Wagner.

REFERENCIAS

Balzarini MG; González L; Tablada M; Casanoves F; Di Rienzo JA; Robledo CW, 2008. INFOSTAT: Manual del Usuario. Córdoba: Editorial Brujas.

Dowdall R., 1982. Criando Criollos, Texas University, Editorial Hemisferio Sur.

González del Pino F; Escalante F; Wilde O., 2009. Técnicas de Impronta, sociabilización y manejo intensivo temprano. www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030309/030924.pdf

King M., 2002. La curva del aprendizaje, Anuario Quarter Horse USA.

Lansade L; Bertrand M;Bouissou M., 2005. Effects of neonatal handling on subsequent manageability, reactivity and learning ability of foals. Applied Animal Behaviour Science. 92, 143-158.

McCulloch CE, Searle SR., 2001.Generalized, Linear, and Mixed Models. New York: John Wiley & Sons.

Miller RM y Cook G., 1997.Imprinting del Potrillo Neonato. Asociación Argentina Criadores de Caballos de Polo, Anuario, www.produccion-animal.com.ar

SAS Institute Inc., 2009. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary. NC: SAS Institute Inc.